

**Substratstereochemie und Untersuchungen zum
Mechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase
aus *Clostridium aminobutyricum***

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Peter Friedrich

aus Marburg/Lahn

Marburg/Lahn 2008

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2003 bis November 2008 am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Buckel durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am _____angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. W. Buckel
Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

für meine Familie
für Christine

Die Ergebnisse dieser Dissertation sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Friedrich P, Darley DJ, Golding BT, Buckel W (2008) The complete stereochemistry of the enzymatic dehydration of 4-hydroxybutyryl coenzyme A to crotonyl coenzyme A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47:3254-3257. Der stereochemische Verlauf der enzymatischen Wassereliminierung von 4-Hydroxybutyryl-Coenzym A zu Crotonyl-Coenzym A. *Angew. Chem.* 120:3298-3301

Martins BM, Messerschmidt A, Friedrich P, Zhang J, Buckel W (2007) 4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase. In: Messerschmidt A (ed) *Handbook of Metalloproteins Online Edition*. John Wiley & Sons Ltd., Sussex, UK. Published online Dez 2007

weitere Veröffentlichungen:

Scott R, Näser U, Friedrich P, Selmer T, Buckel W, Golding BT (2004) Stereochemistry of hydrogen removal from the 'unactivated' C-3 position of 4-hydroxybutyryl-CoA catalysed by 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase. *Chem. Commun. (Camb.)*:1210-1211

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
Verzeichnis der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen:	7
Zusammenfassung	9
Summary	11
1. Einleitung	13
1.1 Glutamatabbau in der anaeroben Nahrungskette	13
1.2 Dehydratasen im anaeroben Stoffwechsel	17
1.3 Funktionen und Vorkommen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	20
1.4 Aufbau, Struktur und Kinetik der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	22
1.5 Mechanistische Modelle.....	23
1.5.1 Zwei Mechanismen der Butyryl-CoA-Dehydrogenase: über Hydridtransfer oder über ein Biradikal zwischen Substrat und FAD-Kofaktor	23
1.5.2 Zwei Mechanismen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: über ein Ketylradikal oder mit Hydridtransfer über 4-Hydroxycrotonyl-CoA	25
1.6 Zielsetzung	28
1.6.1 Stereoselektivität an C2.....	28
1.6.2 Interaktion mit verschiedenen Substraten	28
1.6.3 Stereochemie an C4.....	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Organismen	30
2.2 Expressionskonstrukte.....	30
2.3 Medien für Anzucht von Organismen	30
2.3.1 Anzucht von <i>Clostridium aminobutyricum</i> mit Selektivmedium	30
2.3.2 LB-Medium	31
2.4 Allgemeine biochemische Analysen	32
2.4.1 Eisenbestimmung mit Ferene	32
2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	32
2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.5 Enzymreinigungen	34
2.5.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus <i>Clostridium aminobutyricum</i>	34
2.5.2 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus <i>Clostridium aminobutyricum</i>	35

2.5.3 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus <i>Clostridium aminobutyricum</i>	36
2.5.4 Reinigung von Crotonase aus Rinderleber	38
2.5.5 Produktion und Reinigung der Malat-Synthase aus <i>Escherichia coli</i>	39
2.6 Enzymaktivitätsbestimmungen	41
2.6.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	41
2.6.2 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase	42
2.6.3 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase	42
2.6.4 Crotonase	43
2.6.5 Malat-Synthase	43
2.6.6 Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ..	44
2.6.7 Aktivitätstest für die Rückreaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	44
2.6.8 Aktivitätsassay der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bei 260 - 290 nm	45
2.7 Substratbestimmungen	46
2.7.1 Acetat	46
2.7.2 4-Hydroxybutyrat	47
2.7.3 Malat	48
2.8 Substratsynthesen	48
2.8.1 Acetyl-CoA (1), Butyryl-CoA (2) und Crotonyl-CoA (3) über Anhydride	48
2.8.2 CoA-Ester-Synthesen über 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase	49
2.8.2.1 4-Hydroxybutyryl-CoA (4)	49
2.8.2.2 Butyryl-CoA (5)	49
2.8.3 Herstellung und Analyse einer Markierung am C2 von Butyryl-CoA über Crotonase	50
2.9 Inhibitorensynthesen	51
2.9.1 Acetoacetyl-CoA (6)	51
2.9.2 3-Hydroxybutyryl-CoA (7)	52
2.9.3 1-Iodo-4-butanol (8)	52
2.9.4 4-Hydroxybutan-CoA-Ether (9)	52
2.10 Analysen zur Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase am C2	53
2.10.1 Reaktion von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA	53
2.10.2 Reaktion mit (S)-[2- ² H ₁]Butyryl-CoA	53
2.10.3 (R)-[2- ² H ₁]Butyryl-CoA (R-5) oder Reaktion mit Butyryl-CoA	54
2.11 Ammonium-Lyaseaktivität der Dehydratase	54
2.12 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	55

2.13 Mössbauer-Spektroskopie – Effekte der Substratbindung	55
2.14 EPR-Spektroskopie – Effekte verschiedener Substrate	57
2.15 ENDOR-Spektroskopie – Effekte der Substratbindung	58
2.16 NMR-Charakterisierung von Syntheseprodukten	59
2.17 NMR-Experimente über chirale Verschiebung.....	59
2.17.1 Europium Tris[3-(Heptafluoro-Propylhydroxymethylene)-(+)-Kampfer]-Ligand	60
2.17.2 Derivatisierung zu chiralem (<i>S</i>)-4-Hydroxy-N-(1-phenylethyl)butyrylamid (10)	
mit (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- α -Methylbenzylamin	60
2.17.3 Charakterisierung chiraler Alkohole mit Mosher's Acid	61
2.18 Spektroskopie im sichtbaren bis UV-Bereich	62
2.19 CD-Spektroskopie der Syntheseprodukte	63
2.20 Synthese von γ -[$^2\text{H}_1$]Butyrolactonen zur Untersuchung der Stereoselektivität am C2	63
2.20.1 Synthese über Methionin.....	63
2.20.2 Synthese über 3-Benzyl oxypropan-1-ol.....	68
2.21 Experimente zur chiralen Methylgruppe.....	79
2.21.1 Organische Synthesen	79
2.21.2 Enzymatische Substratsynthesen.....	83
2.21.3 Enzymatische Analyse der chiralen Essigsäure	86
Synthese von Malat aus chiraler Essigsäure	86
Analyse des [3- ^3H , $^2\text{H}_1$]Malats mit Fumarase	87
2.22 Untersuchungen zur Migration von Deuterium vom C2 von 4-Hydroxybutyryl-CoA	
zum C4 von Crotonyl-CoA	87
2.22.1 Synthese von γ -[2- $^2\text{H}_2$]Butyrolacton (2D-16)	87
2.22.2 Enzymatische Analyse mit γ -[2- $^2\text{H}_2$]Butyrolacton (2D-16).....	88
3. Ergebnisse	89
3.1 Stereochemische Untersuchungen.....	89
3.1.1 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_1$]butyryl-CoA ausgehend von 3-Benzyl oxypropan-1-ol.....	90
3.1.2 Methionin als Vorstufe von 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_1$]butyrat	95
3.3 Dehydrogenaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und Stereoselektivität	
der Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus <i>C. aminobutyricum</i>	100
3.4 Vergleich der Synthesen von γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton über NMR Spektroskopie	104
3.4.1 Analyse der Enantiomerenreinheit von γ -Butyrolacton mit chiralen Amidin	105
3.4.2 Analyse der Enantiomerenreinheit von γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton mit Mosher-Säure-	
Ester.....	106

3.4.2.1 γ -[2- ² H ₁]Butyrolacton ausgehend von 3-Benzyl oxypropan-1-ol synthetisiert...	106
3.4.2.2 4-Hydroxybutyrat	107
3.4.3 Europiumliganden mit γ -Butyrolacton	107
3.5 CD-Spektroskopie – Enantiomerenreinheit und absolute Konfiguration der γ -[2- ² H ₁]Butyrolactone.....	112
3.6 Stereoselektive Bildung der chiralen Methylgruppe von Crotonyl-CoA.....	115
3.6.1 Synthese der am C4 markierten 4-Hydroxybutyrat.....	116
3.6.2 Konfiguration der chiralen Methylgruppe von Crotonyl CoA nach der Reaktion der Dehydratase mit (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)-4-Hydroxy[4- ³ H, ² H ₁]butyrat	120
3.7 Mössbauer-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bei Substratbindung	123
3.8 Endor-Spektroskopie - Interaktion von 4-Hydroxy[4- ¹³ C]butyryl-CoA mit der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.....	126
3.9 Ammonium-Lyaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	133
3.10 UV-Vis – substratabhängiger Übergang vom Benzo- zum Semichinon.....	137
3.11 EPR-Effekte verschiedener Substrate auf die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	140
3.11.1 Zeitliche Abhängigkeit der Spinkonzentrationen von Substrat und Inkubationszeit bei 77 K.....	142
3.11.2 Vergleich der Effekte verschiedener Substrate auf Spinkonzentrationen und Auftreten neuer Signale bei 10 – 18 K	144
3.12 Spezifische Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Inhibitoren	150
3.13 Versuche zum Nachweis der Migration von Deuterium von C2 in 4-Hydroxybutyryl-CoA zu C4 in Crotonyl-CoA.....	151
3.14 Succinatsemialdehyd als alternatives Substrat der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase	155
4. Diskussion.....	156
4.1 Stereoselektivität der Substratsynthesen	158
4.1.1 4-Hydroxy[2- ² H ₁]butyryl-CoA über 3-Benzyl oxypropan-1-ol.....	158
4.1.2 4-Hydroxy[2- ² H ₁]butyryl-CoA über Methionin.....	160
4.2 Mechanismus der Synthese von γ -Ethoxybutyrolacton	164
4.3 Stereoselektivität und Überlegungen zum Mechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase	166
4.3.1 Substratbindemodell der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und katalytisch aktive Elemente	166

4.3.2 Spektroskopische Untersuchungen mit verschiedenen Substraten.....	171
4.3.3 Butyryl-CoA als Substrat der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.....	175
4.3.4 Reaktionsmechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase.....	175
4.3.5 Ausblick und Schluß	177
Literaturverzeichnis.....	180

Abkürzungsverzeichnis

4-HBDH	4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase
4-HBCD	4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
DTE	Dithioerythritol
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoat)
DTT	Dithiothreitol
ENDOR	Electron nuclear double resonance
INT	Iodonitrotetrazoliumchlorid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin

Verzeichnis der in dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen:

Substanz- nummer		Seite
1.	Acetyl-CoA	48
2.	Butyryl-CoA	48
3.	Crotonyl-CoA	48
4.	4-Hydroxybutyryl-CoA	49
5.	Butyryl-CoA	49
<i>S</i> -5.	(<i>S</i>)-[2- ² H ₁]Butyryl-CoA	50
<i>R</i> -5	(<i>R</i>)-[2- ² H ₁]Butyryl-CoA	54
6.	Acetoacetyl-CoA	51
7.	3-Hydroxybutyryl-CoA	52
8.	1-Iodo-4-butanol	52
9.	4-Hydroxybutan-CoA-Ether	52
10.	(<i>S</i>)-4-Hydroxy-N-(1-phenylethyl)butyrylamid	60
11.	3-Benzylloxy[1- ² H ₁]propyl (2 <i>R</i>)-3,3,3-Trifluoro- 2-methoxy-2-phenylpropanoat	61
<i>S</i> -12.	(<i>S</i>)-2-Bromo-4-methylthiobuttersäure	63
<i>R</i> -12.	(<i>R</i>)-2-Bromo-4-methylthiobuttersäure	64
<i>R</i> -13.	(<i>R</i>)-4-Methylthio[2- ² H ₁]buttersäure	64
<i>S</i> -13.	(<i>S</i>)-4-Methylthio[2- ² H ₁]buttersäure	64
<i>R</i> -14.	(<i>R</i>)-4-Methylthio[2- ² H ₁]buttersäuremethylester	65
<i>S</i> -14.	(<i>S</i>)-4-Methylthio[2- ² H ₁]buttersäuremethylester	65
<i>R</i> -15.	(<i>R</i>)-4-Hydroxy[2- ² H ₁]buttersäure	66
<i>S</i> -15.	(<i>S</i>)-4-Hydroxy[2- ² H ₁]buttersäure	66
<i>R</i> -16.	(<i>R</i>)-γ-[2- ² H ₁]Butyrolacton	66; 76
<i>S</i> -16.	(<i>S</i>)-γ-[2- ² H ₁]Butyrolacton	66; 77
<i>R</i> -17.	(<i>R</i>)-[2- ² H ₁]Buttersäure	67
<i>S</i> -17.	(<i>S</i>)-[2- ² H ₁]Buttersäure	68
18.	3-Benzylloxypropansäure	68
19.	3-Benzylloxy[1- ² H ₂]propan-1-ol	69
20a.	3-Benzylloxy[1- ² H ₁]propanal	70
20b.	3-Benzylloxypropanal	70

S-21.	(S)-3-Benzylloxy[1- ² H ₁]propan-1-ol	71
R-21.	(R)-3-Benzylloxy[1- ² H ₁]propan-1-ol	71
S-22.	(S)-3-Benzylloxy[1- ² H ₁]propanoylsilat	72
R-22.	(R)-3-Benzylloxy[1- ² H ₁]propanoylsilat	72
R-23.	(R)-4-Benzylloxy[2- ² H ₁]butan-1-nitril	73
S-23.	(S)-4-Benzylloxy[2- ² H ₁]butan-1-nitril	73
R-24.	(R)-4-Benzylloxy[2- ² H ₁]butyrylamid	74
S-24.	(S)-4-Benzylloxy[2- ² H ₁]butyrylamid	75
R-25.	(R)-4-Hydroxy[2- ² H ₁]butyrylamid	75
S-25.	(S)-4-Hydroxy[2- ² H ₁]butyrylamid	76
R-26.	(R)-[2- ² H ₁]Succinat	77; 78
S-26.	(S)-[2- ² H ₁]Succinat	78
27.	Ethyl[³ H]formiat	79
28a.	Diethyl[² H ₁]formylsuccinat	80
28b.	Diethylformylsuccinat	80
28c.	Diethyl[³ H]formylsuccinat	81
29a.	γ-Ethoxy[4- ² H ₁]butyrolacton	81
29b.	γ-Ethoxybutyrolacton	82
29c.	γ-Ethoxy[4- ³ H]butyrolacton	82
30a.	4-Oxo[4- ² H ₁]butansäure	82
30b.	4-Oxobutansäure	82
30c.	4-Oxo[4- ³ H]butansäure	83
R4T-16.	(R)-γ-[4- ³ H, 4- ² H ₁]Butyrolacton	83
S4T-16.	(S)-γ-[4- ³ H, 4- ² H ₁]Butyrolacton	84
R4D-16.	(R)-γ-[4- ² H ₁]Butyrolacton	84
31a.	[³ H, ² H ₁]Essigsäure aus (R)-γ-[4- ³ H, 4- ² H ₁]Butyrolacton	85
31b.	[³ H, ² H ₁]Essigsäure aus (S)-γ-[4- ³ H, 4- ² H ₁]Butyrolacton	85
32.	Synthese von Malat aus chiraler Essigsäure	86
2D-16.	γ-[2- ² H ₂]Butyrolacton	87

Zusammenfassung

Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ist das Schlüsselenzym in der Fermentation von 4-Aminobutyrat zu Acetat, Ammoniak und Butyrat in *Clostridium aminobutyricum*. Darüber hinaus wurde die Dehydratase im 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat Zyklus in *Metallosphaera sedula* als Bindeglied des bisher unentdeckten fünften CO₂-Fixierungsweges nachgewiesen. Dieses außer Clostridien nun auch in Archaeen entdeckte Enzym ist ein Homotetramer, in dem jede der 56 kDa Untereinheiten einen [4Fe-4S]-Cluster und einen FAD-Kofaktor enthält. Es katalysiert die ungewöhnlich reversible Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA, die die Abstraktion des nicht aktivierten β -Protons (pK ca. 40) von 4-Hydroxybutyryl-CoA erfordert. Der postulierte Mechanismus über ein Enoxyradikalintermediat, das zusammen mit Wasserstoffbrückenbindungen zum Thioestercarbonyl den pK auf 8 absenkt, wurde in EPR-Studien untersucht. Es wurde substratinduziert bisher eindeutig nur das Flavinsemichinonradikal sowie möglicherweise ein [4Fe-4S]⁺-Cluster-Signal, jedoch kein Substratradikal nachgewiesen. Die Aufklärung der Kristallstruktur offenbarte große strukturelle Ähnlichkeiten zu den Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenasen. Obwohl bisher kein Kokristall mit Substrat vorliegt, kann daraus ein Substratbindemodell abgeleitet werden. Wie aus der Kristallstruktur hervorgeht, sind die für die Katalyse in Frage kommenden Aminosäurereste His292, Glu455 und Glu257 sowie der FAD-Kofaktor und der [4Fe-4S]-Cluster im hypothetischen aktiven Zentrum lokalisiert.

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Substratstereochemie und Untersuchung der Interaktion mit den Kofaktoren zur Bestätigung des Bindemodells. Dafür wurden stereoselektiv isopenmarkierte 4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA-Ester ausgehend von 3-Benzyl oxypropan-1-ol über chirale Reduktion mit ALPINE-BORANETM und anschließender Kettenverlängerung synthetisiert. Untersuchungen der Reaktionsprodukte mit MALDI-TOF-MS zeigten eine Abstraktion des 2*Re*-Protons. Zusammen mit der zuvor festgestellten Abstraktion des 3*Si*-Protons kann nun für die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und die Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase dieselbe Stereoselektivität bestätigt werden. Die ungewöhnliche Koordinierung mit His292 zeigt, dass das Fe1 des Clusters als Lewis-Säure bei der Abstraktion der Hydroxylgruppe des Substrats, analog zur Aconitase, wirken könnte. In der vorliegenden Arbeit konnte hierfür ein Indiz durch Mössbauerstudien erbracht werden. Weder ENDOR- noch EPR-Studien konnten bisher eine Cluster-Substratinteraktion oder die postulierten Substratradikalintermediate nachweisen. Untersuchungen mit UV-Vis-Spektroskopie des im oxidierten Zustand aktivsten Enzyms

zeigen nach Zugabe verschiedener Substrate „charge-transfer“-Phänomene und einen unterschiedlich raschen Übergang zum Semichinonzustand. Die stereoselektive Synthese von 4-Hydroxy[4-³H, ²H₁]butyryl-CoA über 4-Oxo[4-²H₁]butyrat ausgehend von Diethylformylsuccinat erlaubte die Untersuchung der Stereoselektivität der Eliminierung der Hydroxylgruppe. Die Analyse der Konfiguration der Methylgruppe des [4-³H, ²H₁]Crotonyl-CoA über chirale Essigsäure zeigte, dass die Wassereliminierung stereoselektiv mit Retention abläuft und bezüglich des β -Protons als *anti*-Eliminierung beschrieben werden kann. Diese Resultate bestätigen somit das aus der Kristallstruktur abgeleitete Substratbindemodell.

Summary

4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase is the key enzyme in the fermentation of 4-aminobutyrate to acetate, ammonia and butyrate in *Clostridium aminobutyricum*. The dehydratase was also detected in the 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate cycle in the archaeon *Metallosphaera sedula* acting as the missing link in the newly discovered 5th CO₂ fixation pathway. The homotetrameric enzyme consists of 56 kDa subunits each containing one [4Fe-4S]-cluster and one FAD-cofactor. It catalyses the unusual reversible dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA to crotonyl-CoA, which requires the abstraction of the unactivated β -proton (pK ca. 40) of 4-hydroxybutyryl-CoA. The postulated mechanism via an enoxyradical intermediate, which together with hydrogen bonding to the thioester carbonyl lowers the pK to 8, was examined in EPR-studies. Until now only the semiquinone radical and possibly a [4Fe-4S]⁺-cluster-signal could be detected but thus far there is no evidence for a substrate radical. The recently solved crystal structure revealed a great structural similarity to that of the medium chain acyl-CoA dehydrogenases. As there is no cocrystal with substrate yet, the medium chain acyl-CoA dehydrogenase was used to devise a substrate binding model for the 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase. The FAD cofactor, the [4Fe-4S]-cluster and the amino acid residues His292, Glu455 and Glu257 are located in the putative active site and therefore are possible catalytically active elements.

The main goal of this work was to solve the substrate stereochemistry and to confirm the substrate binding model by investigation of cofactor interactions. To this end stereoselectively labelled 4-hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoAs derived from 3-benzyloxypropan-1-ol via chiral reduction with ALPINE-BORANETM and subsequent carbon chain elongation were synthesised. Analysis of the reaction products with MALDI-TOF-MS showed loss of the 2*Re*-proton. Together with the previously determined abstraction of the 3*Si*-proton it could be demonstrated that the 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase and the medium chain acyl-CoA dehydrogenase share the same stereoselectivity. The unusual coordination of Fe1 of the cluster with His292 implies an aconitase like function as a Lewis acid in the abstraction of the substrate's hydroxyl group. In this work this was supported by the Mössbauer studies. So far neither ENDOR nor EPR studies could reveal a substrate-cluster interaction or a substrate derived radical intermediate. Examination with UV-vis spectroscopy of the enzyme in the oxidized most active state showed a charge transfer together with conversion to the semiquinone state at variable rates upon addition of various substrates. The stereoselective synthesis of 4-hydroxy[4-³H, ²H₁]butyryl-CoA via 4-oxo[4-²H₁]butyrate starting from

diethylformylsuccinate permitted the determination of the stereoselectivity of the elimination of the hydroxyl group. Analysis of the configuration of the methyl group of [4-³H,²H₁]crotonyl-CoA via chiral acetic acid showed that the elimination of water proceeds stereoselectively with retention of configuration and can be described as *anti*-elimination regarding the β-proton. These results confirm the substrate binding model derived from the crystal structure.

1. Einleitung

1.1 Glutamatabbau in der anaeroben Nahrungskette

In der anaeroben Nahrungskette werden natürliche Polymere wie Peptide und Zucker zu Methan und CO₂ abgebaut. Proteine werden dabei von exogenen Proteasen zu Aminosäuren und Peptiden gespalten, welche von fermentativen Bakterien zu Ammoniak, CO₂, Wasserstoff, Acetat und kurzkettigen Fettsäuren abgebaut werden. Acetogene Organismen nutzen das entstandene CO₂ und H₂ zur Synthese von Acetat, während syntrophe Bakterien die kurzkettigen Fettsäuren zu Acetat, CO₂ und Wasserstoff oxidieren. Letztere Reaktionen sind nur dann exergon, wenn der Wasserstoffpartialdruck von methanogenen Archaeen durch die Reduktion von CO₂ zu Methan auf sehr niedrigem Niveau gehalten wird. Die vielseitigsten Organismen der anaeroben Nahrungskette sind die fermentativen Bakterien, zu denen auch die heterogene Ordnung der *Clostridiales* (*Firmicutes*, *Bacteria* phylum XIII) zählt. Diese setzt sich, wie 16 S rRNS Analysen gezeigt haben, aus 19 Untergruppen zusammen (Collins et al. 1994). Sie enthält sowohl sporenbildende als auch nicht sporenbildende anaerobe Eubakterien und kommt im Boden, Klärschlamm, Süßwassersedimenten sowie im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren vor. Eine Besonderheit der Clostridien ist die Fermentation von Aminosäuren zu Acetat, CO₂, H₂, NH₃ und verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren. Für jede der 20 Aminosäuren ist mindestens ein Abbauweg bekannt (Barker 1961; Barker 1981). Für Glutamat wurden sogar fünf verschiedene Abbauwege beschrieben (Buckel 2001b):

1. Der klassische 3-Methylaspartatweg, der vorwiegend in Bodenbakterien zu finden ist, wurde zuerst in *Clostridium tetanomorphum* (*Clostridiaceae*) (Barker 1978) und für eine Reihe weitere Clostridien (z. B. *C. tetani*, *C. cochlearium*, *C. lentoputrescens*, *C. limosum* und *C. malenominatum*) beschrieben (Buckel und Barker 1974; Buckel 1980a). Hier wird (*S*)-Glutamat Coenzym-B₁₂ abhängig zu (2*S*,3*S*)-3-Methylaspartat umgelagert, welches weiter zu Ammoniak, Acetat und Pyruvat abgebaut wird. Letzteres wird nun, begleitet von Wasserstoffbildung, zu Acetyl-CoA decarboxyliert, welches entweder direkt zu Acetat umgewandelt oder zu Buttersäure reduziert wird. Pro Mol Glutamat werden dabei über Substratstufenphosphorylierung 0,6 Mol ATP konserviert (Thauer et al. 1977; Buckel und Miller 1987; Härtel und Buckel 1996). Durch die Umlagerung des Kohlenstoffskeletts im ersten Schritt wird die Eliminierung

von Ammonium ermöglicht. Während der β -Wasserstoff im Glutamat nicht azid ist (pK ca. 40), steht im 3-Methylaspartat der β -Wasserstoff in α -Position zu einer über H-Brücken und ionischen Wechselwirkungen gebundenen Carboxylgruppe, die die Azidität auf ca. $pK = 8$ erhöht. Auch die weiter im Stoffwechselweg beteiligten Dehydratasereaktionen, Mesaconase und Crotonase, eliminieren zusammen mit der Hydroxylgruppe ein in α -Position zu einer Carboxylgruppe oder Thioester stehendes und damit ebenfalls aktiviertes Proton.

2. Eine Variante des 3-Methylaspartatwegs ergibt sich, wenn Pyruvat zu Oxalacetat carboxyliert wird und damit eine Disproportionierung zu Acetat, CO_2 und Propionat eingeleitet wird. So werden 2 ATP über Acetyl-CoA und bis zu $2 \times (2/3)$ ATP über einen Protonengradienten durch Fumaratatmung im Succinatweg mit Propionat als Endprodukt konserviert (Lancaster et al. 1999). Dieser Stoffwechselweg wurde in *Selenomonas acidaminophila* (Nanninga et al. 1987) und in *Barkera propionica* (J. Sievers, W. Liesack, W. Buckel, unveröffentlichte Daten) gefunden, welche zur Familie der *Acidaminococcaceae* gehören. Der in der Fumaratatmung vorkommende Dehydrataseschritt durch Fumarase beinhaltet ebenfalls die Abstraktion eines aktivierten α -Protons von (*S*)-Malat.
3. Der 2-Hydroxyglutaratweg wird vor allem von Clostridien im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren beschritten. (*S*)-Glutamat wird dabei oxidativ zu α -Ketoglutarat deaminert, welches zum namensgebend (*R*)-2-Hydroxyglutarat reduziert wird. Dieses wird in mehreren Schritten in Glutaconyl-CoA umgewandelt und zu Crotonyl-CoA decarboxyliert. Im Weiteren wird Crotonyl-CoA zur Energiegewinnung zu Acetat, Butyrat und Wasserstoff disproportioniert. Zusätzliche Energie wird hierbei über einen elektrochemischen Natriumgradienten gewonnen, der bei der Decarboxylierung von Glutaconyl-CoA aufgebaut wird (Buckel 2001a). Der Stoffwechselweg wurde in *Acidaminococcus fermentans* (*Acidaminococcaceae*), *Clostridium sporosphaeroides*, *Clostridium symbiosum*, *Fusobacterium nucleatum* (*Fusobacteriaceae*) und *Peptostreptococcus asaccharolyticus* (*Peptostreptococcaceae*) gefunden (Buckel und Barker 1974; Buckel 1980a). Im Gegensatz zu den Dehydrataseschritten im 3-Methylaspartatweg wird bei der reversiblen *syn*-Eliminierung von Wasser aus (*R*)-2-Hydroxyglutaryl-CoA zu (*E*)-Glutaconyl-CoA das nicht aktivierte 3-*Si*-Proton in β -Position relativ zu einem CoA-Ester abgespalten (Buckel 1980b; Schweiger et al. 1987; Hans et al. 2000). Die Initiation der Reaktion der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-

Dehydratase erfolgt durch eine Einelektronen-Reduktion des Substrats. Zur Aktivierung des Enzyms wird ein zusätzliches Aktivatorprotein benötigt, das unter ATP-Hydrolyse das als Kofaktor in der Katalyse genutzte Elektron zur Verfügung stellt.

4. Die reichlich vorhandene und vielseitige Aminosäure Glutamat wird von vielen aeroben und anaeroben Organismen in andere Aminosäuren umgewandelt, welche dann von den Clostridien fermentiert werden. So reagiert z.B. *Escherichia coli* auf Säurestress, indem es Glutamat unter Verbrauch eines Protons zu 4-Aminobutyrat decarboxyliert (Castanie-Cornet et al. 1999). 4-Aminobutyrat (GABA) wird auch in eukaryotischen Zellen gebildet und dient als Neurotransmitter (Herdegen 1997). Diese γ -Aminosäure kann z. B. von *Clostridium aminobutyricum* über 4-Hydroxybutyryl-CoA und Crotonyl-CoA zu Acetat und Butyrat fermentiert werden (Hardman und Stadtman 1960). Die Enthalpie der Reaktion $\Delta G^{\circ'} \approx -37 \text{ kJ mol}^{-1}$ wurde aus $\Delta G^{\circ'f}$ (Thauer et al. 1977) errechnet. Dieses wiederum wurde aus der Energiebilanz ($\Delta G^{\circ'} \approx 30 \text{ kJ mol}^{-1}$) der Decarboxylierung von Glutamat zu 4-Aminobutyrat geschätzt (Buckel 2001a). Bei $\Delta G^{\circ'} \approx 74 \text{ kJ mol}^{-1}$ für ATP werden also pro Mol 4-Aminobutyrat 0,5 Mol ATP konserviert.

Die Fermentation über Decarboxylierung von Glutamat zu 4-Aminobutyrat ist außer für *C. aminobutyricum* bisher nur für *Clostridium homopropionicum* (Dorner und Schink 1990), *Pelobacter acetylenicus* (Meckenstock et al. 1999) und *Anaerovorax odorimutans* (Matthies et al. 2000) beschrieben worden. In diesen Beispielen werden zwei Organismen für den kompletten Reaktionszyklus ausgehend von Glutamat benötigt, indem 4-Aminobutyrat von einem anderen Organismus bereitgestellt wird. Es gibt jedoch einen Bericht, der eine Fermentation von Glutamat über 4-Aminobutyrat in einem Organismus für einige *Fusobacterium* Spezies beschreibt (Gharbia und Shah 1991), aber eindeutige Belege stehen noch aus. Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase katalysiert hierbei die Schlüsselreaktion. Ähnlich der Reaktion der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase wird auch hier ein nicht aktiviertes β -Proton abstrahiert, aber die Reaktionssequenz wird durch eine Einelektronen-Oxidation des Substrats eingeleitet, wobei FAD und ein [4Fe-4S]-Cluster als Kofaktoren dienen. Außerdem benötigt das Enzym keinen Aktivator.

5. Ein weiterer Weg eröffnet sich über die Reduktion von Glutamat zur osmoprotektiven Aminosäure Prolin bei der Antwort von *Bacillus subtilis* auf osmotischen Stress (Bremer und Krämer 2000). In der Fermentation nach Stickland wird dieses von *Clostridium sporogenes* zu 5-Aminovalerat reduziert (Stickland 1935; Barker 1961). Diese δ -Aminosäure kann von *Clostridium viride* über 5-Hydroxyvaleryl-CoA und 2-Pentenoyl-CoA zu Ammoniak, Acetat, Propionat und Valerat fermentiert werden (Buckel et al. 1994). Die Energiebilanz der Reaktion $\Delta G^{\circ'} \approx -37 \text{ kJ mol}^{-1}$ wurde über $\Delta G^{\circ'f}$ von 5-Aminovalerat und 4-Aminobutyrat unter der Annahme errechnet (Thauer et al. 1977), dass dieser Wert dem der unsubstituierten Fettsäuren entspricht. So können 0,5 Mol ATP pro Mol 5-Aminovalerat konserviert werden. Insgesamt sind für diesen Abbauweg von Glutamat sogar drei Organismen nötig.

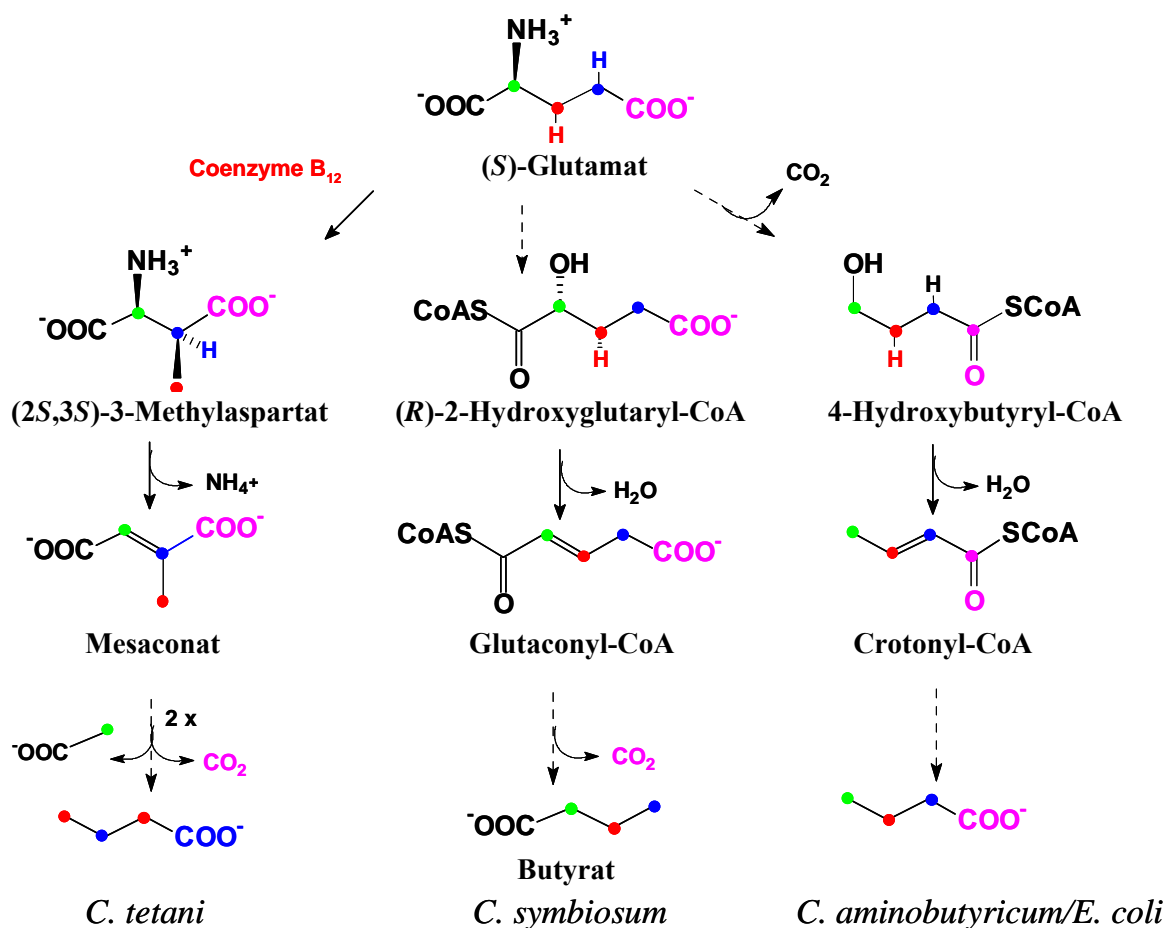


Abbildung 1. Gegenüberstellung der Schlüsselreaktionen der Fermentation von Glutamat über Methylaspartat, Hydroxyglutarat und 4-Aminobutyryl-CoA (Wolfgang Buckel, Philipps-Universität Marburg, persönliche Mitteilung)

Während für den 3-Methylaspartatweg B₁₂-abhängige Umlagerungen des Kohlenstoffgerüsts erforderlich sind, wird die Herkunft der Kohlenstoffatome des Butyrats für den 2-Hydroxyglutarat und den 4-Aminobutyratweg nur über den Zeitpunkt des Decarboxylierungsschritts bestimmt (Abbildung 1). Im Unterschied zum 3-Methylaspartatweg laufen die Schlüsselreaktionen des 2-Hydroxyglutaratwegs und des 4-Aminobutyratwegs auf CoA-Ester-Ebene ab. Beide benötigen als Schlüsselenzym eine Dehydratase, die ein ungesättigtes Produkt erzeugt. Dieses wird zur Energiekonservierung zu Acetat oxidiert und zu Butyrat reduziert (Buckel 2001b). Beide Dehydratasen abstrahieren ein nicht aktiviertes β -Proton über einen radikalischen Mechanismus, jedoch leitet die 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase die Katalyse über eine Einelektronen-Reduktion des Substrats ein und benötigt ein Aktivatorprotein, welches ein Elektron auf das Enzym überträgt (für einen aktuellen Übersichtsartikel siehe (Buckel und Golding 1999; Buckel und Golding 2006). Die initiale Oxidation des Substrats durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase benötigt keine Aktivierung von außen.

1.2 Dehydratasen im anaeroben Stoffwechsel

Von den etwa 100 in der Enzymnomenklaturdatenbank (EC 4.2.1.-) gelisteten Dehydratasen (Hydro-Lyasen) katalysieren die meisten die Eliminierung von Wasser aus β -Hydroxyketonen, β -Hydroxycarbonsäuren und β -Hydroxyacyl-CoA-Derivaten. Die α -Protonen sind hierbei durch die benachbarten Carbonylfunktionen aktiviert. Im Krebs-Zyklus zum Beispiel wird Zitrat zu (Z)-Aconitat dehydratisiert und anschließend zu (2R,3S)-Isocitrat hydratisiert. Fumarat wird anschließend zu (S)-Malat hydratisiert. In der Glycolyse katalysiert die Enolase die Dehydratisierung von (S)-2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat. Alle diese reversiblen Dehydratisierungen von freien Säuren sind stereoselektiv für eine *anti*-Eliminierung der Hydroxylgruppe (Creighton und Murthy 1990). Eine Ausnahme hiervon bildet die Reaktion von (2S,3S)-Methylcitrat zu (Z)-2-Methyлаconitat im Methylcitratzyklus, über den Propionat zu Pyruvat oxidiert wird (Brock et al. 2002), die über eine *syn*-Eliminierung verläuft.

Ein weiterer Dehydratasetyp kommt im Stoffwechsel von Zuckersäuren und der Biosynthese von verzweigten Aminosäuren vor. 2,3-Dihydroxysubstrate werden hierbei zunächst zu α,β -ungesättigten 2-Hydroxysäuren umgewandelt. Die Stereoselektivität dieser Reaktionen

lässt sich aufgrund der sich anschließenden Tautomerisierung zu 2-Oxosäuren nur über die Kristallstruktur der Enzyme aufklären. So katalysiert die Glucarat-Dehydratase von *Pseudomonas putida* abhängig vom Substrat entweder eine *syn*- oder eine *anti*-Eliminierung von Wasser (Palmer et al. 1998). In gleicher Weise werden die 3-Hydroxysäuren Serin und Threonin zu den entsprechenden Enaminosäuren umgewandelt und schließlich zu Pyruvat hydrolysiert. Diese 2,3-Dihydroxysäure-Dehydratasen und die bakteriellen L-Serin-Dehydratasen aktivieren dabei die Hydroxylgruppe über ein Eisen-Schwefel-Zentrum, während die eukaryotischen L-Serin-Dehydratasen und alle L-Threonin-Dehydratasen den pK -Wert des α -Protons durch die Bildung einer Schiff'schen Base zwischen der Aminogruppe und Pyridoxal-5'-phosphat senken (Hofmeister et al. 1993).

Die in der Fettsäurebiosynthese und β -Oxidation beteiligten Dehydratasen katalysieren vorwiegend *syn*-Eliminierungen von Thioestern (CoA-Estern oder Acyl-Träger-Proteinen) einfacher β -Hydroxyfettsäuren (Willadsen und Eggerer 1975). Ein weiteres Beispiel für eine *syn*-Eliminierung sind Dehydratisierungen von β -Hydroxyketonen mit der 3-Dehydrochinasäure-Dehydratase aus *E. coli* (Hanson und Rose 1963). Die einzige bekannte Ausnahme für Dehydratasen dieses Typs ist die *anti*-Eliminierung von Wasser aus 3-Dehydrochinasäure zu 3-Dehydroshikimat einer in Pilzen entdeckten Dehydratase (Harris et al. 1993).

In den meisten Fällen scheint der pK -Wert des zu entfernenden Protons die Stereoselektivität festzulegen. β -Hydroxyketone und β -Hydroxyacyl-CoA Substrate mit einem pK -Wert von circa 21 (Amyes und Richard 1992) führen zu *syn*-Eliminierung, während β -Hydroxysäuren mit einem pK -Wert von ca. 30 schrittweise über *anti*-Eliminierung umgesetzt werden (Creighton und Murthy 1990).

Die bisher aufgezählten Dehydratasen senken die pK -Werte ihrer Substrate durch Salzbrücken zwischen Argininresten oder Magnesiumionen, welche an Carboxylatsubstrate binden, oder über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Amid- des Peptidrückgrats an die Carbonylfunktionen von Thioestersubstraten. Die pK -Werte der α -Protonen werden dadurch auf ca. 7-8 in den Bereich der Basenstärke von Histidin- oder Carboxylatseitenketten abgesenkt (Engst et al. 1999; Bahnson et al. 2002; Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b).

Bei der Fermentation von Aminosäuren in anaeroben Bakterien macht jedoch die Dehydratisierung von α -, γ - und δ -Hydroxylgruppen die Entfernung von Protonen erforderlich, die nicht durch die Nachbarschaft zu Carbonylfunktionen aktiviert werden

können und initiale pK -Werte von ca. 40 aufweisen. Es wurde für diese Dehydratisierungen ein Mechanismus über Enoxy- Ketyl- und Dienoxyradikalintermediate vorgeschlagen, welche eine Aktivierung des Substrats ermöglichen (Buckel und Golding 1999).

Für die Dehydratation von 2-Hydroxyacyl-CoA-Estern wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, in dem eine Einelektronen-Reduktion des elektrophilen Thioestersubstrats zu einem nukleophilen Ketylradikal (eine sogenannte Umpolung) erfolgt (Buckel und Keese 1995b; Buckel und Keese 1995a; Buckel und Golding 1999). Die Eliminierung der Hydroxylgruppe erzeugt ein Enoxyradikal, das zum allylischen Produkt-Ketylradikal deprotoniert wird (Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b). Die Oxidation des Produktradikals zum Enoyl-CoA-Produkt durch das Enzym und die Weitergabe an das nächste Substratmolekül schließt den katalytischen Zyklus ab (Müller und Buckel 1995). Die sieben bisher charakterisierten Dehydratasen dieser Gruppe benötigen zur Aktivierung ein zusätzliches Aktivatorprotein [für einen aktuellen Übersichtsartikel siehe (Buckel et al. 2005; Kim et al. 2008)]. Diese Aktivatoren reduzieren durch Einelektronenübertragung von ihren Fe-S-Clustern die Fe-S-Zentren der Dehydratasen. Die Hydrolyse von 2 ATP pro Elektron senkt dabei das Redoxpotential des [4Fe-4S]-Clusters der Aktivatoren von ca. -300 auf wahrscheinlich -900 mV und ermöglicht so erst die Reduktion der Dehydratasen. Analog zu der Aktivierung bei Nitrogenasen erfolgt in den Aktivatoren der Dehydratasen eine Konformationsänderung des Winkels einer Helix-Cluster-Helix Architektur, die an die Entspannung einer Bogensehne erinnert, weshalb die Aktivatoren als Archerasen bezeichnet wurden (Buckel 2003). Der vorgeschlagene Mechanismus konnte inzwischen über den Nachweis von auf Kohlenstoff basierten organischen Radikalen mittels EPR-Spektroskopie bestätigt werden. Hierbei konnte das mesomeriestabilisierte allylische Produkt-Ketylradikal in der Reaktion der 2-Hydroxyisocaproyl-Dehydratase zu 2-Isocaprenoyl-CoA aus *Clostridium difficile* nachgewiesen werden (Kim et al. 2004; Kim et al. 2008).

1.3 Funktionen und Vorkommen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Die reversible Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erfordert ebenfalls die Abstrahierung eines nicht aktivierten Protons des Substrats (pK ca. 40). Dieses Enzym wurde erstmals aus *C. aminobutyricum* gereinigt. Dieser strikt anaerob lebende sporenbildende Organismus wurde aus Sumpfschlamm in North Carolina isoliert (Hardman und Stadtman 1960). Die Fermentation von 4-Aminobutyrat durch *C. aminobutyricum* wurde bereits 1963 aufgeklärt (Hardman und Stadtman 1963) und durch Identifizierung des Schlüsselenzyms 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bestätigt (Willadsen und Buckel 1990). 4-Aminobutyrat wird zunächst mit 2-Oxoglutarat zu Glutamat und Succinatsemialdehyd transaminiert. Dieser wird dann zu 4-Hydroxybutyrat reduziert und mit Acetyl-CoA oder Butyryl-CoA als Donor auf Coenzym A übertragen. Das gebildete 4-Hydroxybutyryl-CoA wird nun zu Crotonyl-CoA dehydratisiert. Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase katalysiert interessanterweise ebenfalls die Δ^2, Δ^3 -Isomerisierung von Vinylacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA (Abbildung 2), was die Einschleusung von Vinylacetat in den Stoffwechselweg ermöglicht (Scherf und Buckel 1993).

Im reduktiven Teil des Stoffwechselweges wird Crotonyl-CoA zu Butyryl-CoA reduziert und dann als CoA-Donor genutzt. Im oxidativen Teil wird Crotonyl-CoA über β -Oxidation zu Acetyl-CoA umgewandelt und ATP über Substratstufenphosphorylierung konserviert (Scherf und Buckel 1991; Gerhardt et al. 2000; Buckel 2001b). Eine weitere Möglichkeit zur Fermentation über 4-Hydroxybutyryl-CoA in *C. kluyveri* ist die Succinatreduktion. Hierbei wird zunächst Succinat zu Succinyl-CoA aktiviert und danach zu Succinatsemialdehyd reduziert (Abbildung 2), welches dann wie oben weiter zu Butyrat reduziert wird (Scherf et al. 1994).

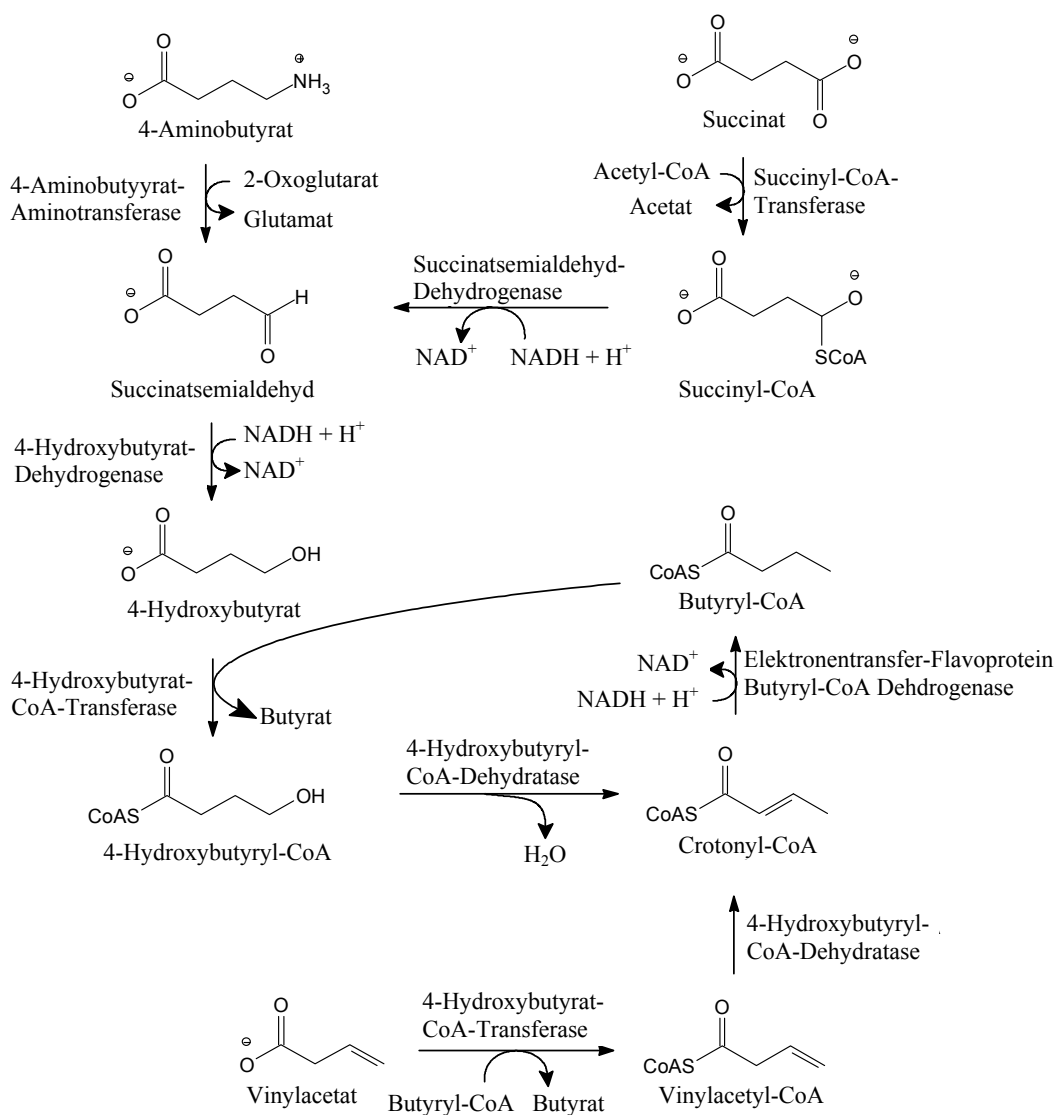


Abbildung 2. Reduktiver Teil der Fermentationen von 4-Aminobutyrat in *C. aminobutyricum* und Succinat in *C. kluyveri* zu Butyrat, Acetat und Ammoniak. Unten ist die Einschleusung von Vinylacetat in den Stoffwechsel angeführt (Gerhardt et al. 2000).

Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase auch in der autotrophen CO_2 -Fixierung von Archaeen (oder Archaeobakterien) vorkommt (Berg et al. 2007). Im 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat Zyklus in *Metallosphaera sedula* wurde gezeigt, dass Acetyl-CoA über Malonyl-CoA zu Propionyl-CoA reduziert und weiter zu Methylmalonyl-CoA carboxyliert wird. Dieses wird zu Succinyl-CoA isomerisiert und analog zum Stoffwechselweg in *C. kluyveri* (Scherf et al. 1994) über 4-Hydroxybutyryl-CoA und Crotonyl-CoA mit anschließender β -Oxidation zu Acetoacetyl-CoA zu zwei Acetyl-CoA gespalten. Somit stellt die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase das fehlende Bindeglied im fünften bisher unentdeckten Weg der CO_2 -Fixierung dar (Berg et al. 2007; Thauer 2007).

1.4 Aufbau, Struktur und Kinetik der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Das Enzym ist ein Homotetramer (4×54 kDa) mit einem FAD und einem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster pro Untereinheit (Müh et al. 1997). Die kinetischen Daten mit unmarkiertem Substrat ($K_m = 22 \pm 1 \mu\text{M}$; $V_{\max}/K_m 0,34 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) zeigen im Vergleich zu denen mit 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_2$]butyryl-CoA ($K_m 27 \pm 1 \mu\text{M}$; $V_{\max}/K_m 0,17 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) und 4-Hydroxy[3- $^2\text{H}_2$]butyryl-CoA ($K_m 20 \pm 1 \mu\text{M}$; $V_{\max}/K_m 0,27 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$) einen leichten Isotopeneffekt für C2 ($D^{(V/K)} 2,00 \pm 0,07$) und C3 ($D^{(V/K)} 1,26 \pm 0,17$) (Çinkaya 1996). Diese Resultate weisen auf eine Abstraktion eines Protons an C2 als initialem Schritt der Katalyse hin (Çinkaya 1996).

Die Kristallstruktur zeigt eine D_2 Symmetrie des Homotetramers bei einer Größe von $92 \times 91 \times 85 \text{ Å}$ (Martins et al. 2004). Zwei katalytisch aktive Dimere mit je zwei aktiven Zentren docken über C-terminale α -Helices am Partner-Dimer an. Die N-terminalen (Met-1 bis Leu143) und C-terminalen (Glu277 bis Lys490) Domänen sind überwiegend α -helical, während die mittlere Domäne (Ile144 bis Gln276) vorwiegend β -Faltblattstrukturen aufweist. Eine sehr ähnliche Faltung findet sich auch in den Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenasen (MCAD, z.B. Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *Sus scrofa*) (Kim und Wu 1988), obwohl die Aminosäuresequenzen nur zu 16 % übereinstimmen.

Aufgrund bisheriger Mössbauer-Spektroskopie-Untersuchungen (Müh et al. 1997) wurde eine symmetrische Koordination des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters angenommen. Die Aminosäuresequenz und die Kristallstruktur zeigen jedoch, dass eine Koordinierung von einem Histidin (His292, C-terminale Domäne) und drei Cysteinen (Cys 99, 103 der N-terminalen Domäne; Cys299 der C-terminalen Domäne) besteht (Martins et al. 2004). Der Cluster liegt am Boden eines engen Substratbindekanals, der aus Aminosäuren beider Monomere des katalytischen Dimers und Teilen des Adenosin- und Isoalloxazinrings des FADs gebildet wird. Der Isoalloxazinring liegt dabei am Schnittpunkt der drei Domänen des Monomers, während der Adenosinrest an der Bindestelle des Dimers lokalisiert ist. FAD wird dabei von den mittleren und C-terminalen Domänen eines Monomers und der C-terminalen Domäne des benachbarten Monomers gebunden. Der Cluster liegt am Boden des aktiven Zentrums, 7 Å (Fe1 des Clusters bis N5 des FADs) von der *Re*-Seite des Isoalloxazinringes entfernt. Die Entfernung der Eisenatome des Cluster zu ihren koordinierenden Thiolaten und Sulfiden liegt in dem für $[2\text{Fe-2S}]$, $[3\text{Fe-4S}]$ und $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster typischen Bereich von $2,3$ bis $2,4 \text{ Å}$ (Martins et al. 2004). Es sind mehrere Clustertypen bekannt, die teilweise von Histidinresten koordiniert

werden, z.B. Rieske-Proteine (Link 1997), die einen [2Fe-2S]-Cluster mit zwei Histidin- und zwei Cystein-Liganden haben oder [NiFe]-Hydrogenasen (Volbeda et al. 1995), in denen der distale [4Fe-4S]-Cluster von drei Cysteinen und einem Histidin koordiniert wird. Hier wird das Fe1 Atom vom N δ 1 Atom des Histidins koordiniert. Das Fe1 Atom des Clusters der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wird jedoch vom N ϵ 2 des His292 koordiniert.

Eine ähnliche Koordinierung ist bisher nur für die [FeFe]Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* (Peters et al. 1998), das Hybrid-Cluster-Protein (Cooper et al. 2000) und die nickelhaltigen Kohlenmonoxyd-Dehydrogenasen (Dobbek et al. 2001; Drennan et al. 2001; Doukov et al. 2002; Darnault et al. 2003) beschrieben worden. Für diese Proteine wurden N ϵ 2-Fe1 Bindungslängen von 1,9 bis 2,1 Å gezeigt. Für die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase jedoch liegt die durchschnittliche Bindungslänge bei 2,4 Å (Martins et al. 2004).

Die hohe strukturelle Ähnlichkeit der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit der Butyryl-CoA-Dehydrogenase erstreckt sich auf die Flavinbindestelle, die allgemeine strukturelle Anordnung von α -Helices und β -Faltblättern in den Domänen der Monomere, die Lage der Substratbindestelle und einige konservierte Aminosäurereste (Glu 455) im aktiven Zentrum.

1.5 Mechanistische Modelle

1.5.1 Zwei Mechanismen der Butyryl-CoA-Dehydrogenase: über Hydridtransfer oder über ein Biradikal zwischen Substrat und FAD-Kofaktor

Die katalytischen Reaktionen der Butyryl-CoA-Dehydrogenase und der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erfordern jeweils die Abstraktion eines unaktivierten Wasserstoffs in β -Position. Der allgemein für die α,β -Dehydrogenasen akzeptierte Mechanismus erfordert die Auflösung von zwei kinetisch stabilen C-H Bindungen (Ghisla und Thorpe 2004). Hierbei wird das α -Proton ($pK = 21$) durch H-Brückenbindungen von Aminosäureresten des Enzyms mit dem Thioestercarbonyl aktiviert (pK ca. 8). Die Abstraktion des α -Protons durch einen konservierten Glutamatrest ist mit der Übertragung eines Hydrids von der β -Position auf den im oxidierten Zustand vorliegenden FAD-Kofaktor gekoppelt (Abbildung 3). Die Reaktion ist stereoselektiv für die *2Re*- und *3Re*-Wasserstoffatome des Substrats (Biellmann und Hirth 1970a; Biellmann und Hirth 1970b; La Roche et al. 1971; Kawaguchi et al. 1980). Die

Aufklärung der Kristallstruktur konnte zeigen, dass die α - und β -Wasserstoffatome die für eine antiperiplanare Reaktion benötigten Positionen einnehmen (Kim et al. 1993). Hierbei sei angemerkt, dass das 3*Si*-Wasserstoffatom in 4-Hydroxybutyryl-CoA dem 3*Re*-Wasserstoffatom in Butyryl-CoA entspricht.

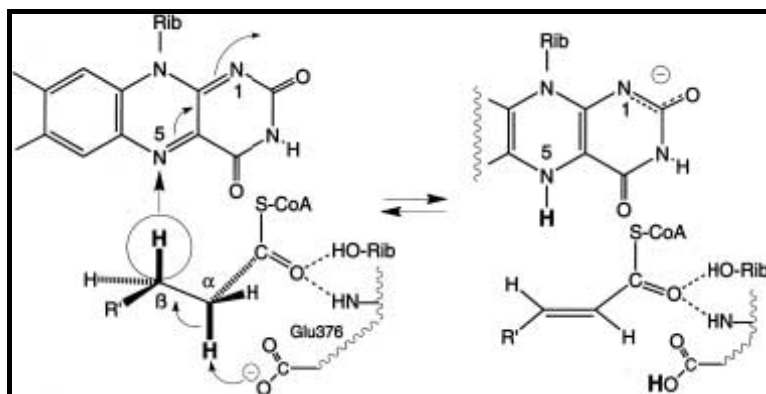


Abbildung 3. Dehydrogenasemechanismus über Hydridtransfer zum oxidierten Flavin (Ghisla und Thorpe 2004)

Ein alternativer Mechanismus über Deprotonierung eines Enoxyradikals wurde von J. W. Cornforth vorgeschlagen und 44 Jahre später theoretisch validiert (Cornforth 1959; Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b). Frühere spektroskopische Untersuchungen (Beinert und Page 1957) und frühere Referenzen darin) ergaben Hinweise auf die Existenz eines Flavinsemichinonradikals. Somit ergibt sich für einen radikalischen Mechanismus folgende Sequenz (Abbildung 4 A): Zuerst erfolgt die basenkatalysierte Enolisierung des Thioesters (a). Dieser überträgt nun ein Elektron auf das Flavin (b), wodurch ein im Enzym unter kontrollierten Bedingungen gebundenes Substratradikal entsteht. Durch die Abstraktion des β -Protons geht dieses in das mesomeriestabilisierte Ketylradikal über (c). Die Abstraktion dieses Protons wird durch die Tatsache erleichtert, dass die vorherige Übertragung eines Elektrons vom Substrat auf das Flavin (b) dieses in das azide Enoxyradikal überführt hat (Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b). Dieser Prozess kann zyklisch beschrieben werden, indem die Oxidation des Enolats einen Elektronenüberschuss erzeugt, der genutzt wird, die Basenstärke des Flavins zu erhöhen damit das β -Proton abstrahiert werden kann. Das dabei auftretende Biradikal wird in Abbildung 4 B dargestellt.

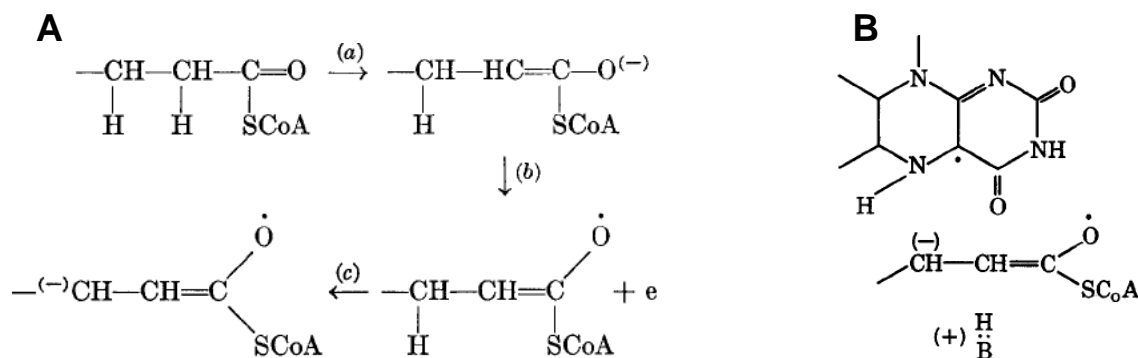


Abbildung 4. (A) Reaktionssequenz der Dehydrogenasen über (B) Biradikal zwischen Substratketyl und Flavinsemichinon (Cornforth 1959)

Ein Hinweis darauf, dass für die Dehydrogenasen ein Hydridtransfermechanismus zutrifft, wurde durch Austausch des Flavinkofaktors durch Deazaflavin erbracht (Ghisla et al. 1984). Dieses ist nicht in der Lage, einzelne Elektronen zu übertragen und tauscht in der reduzierten Form am C5 keine Protonen mit dem Lösungsmittel aus (Manstein et al. 1986; Manstein et al. 1988). 5-Deaza-FADH₂ ist in der Lage, sein C5-Hydrid auf das Enoyl-CoA-Substrat zu übertragen. Die Rate der Reaktion entspricht dabei der des natürlichen Enzyms mit FAD (Ghisla et al. 1984).

1.5.2 Zwei Mechanismen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: über ein Ketylradikal oder mit Hydridtransfer über 4-Hydroxycrotonyl-CoA

Aus der Tatsache, dass 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zur vollen Aktivität oxidiertes Flavin benötigt (Scherf und Buckel 1993) und dass über [4Fe-4S]-Zentren die Möglichkeit zur Polarisierung einer Hydroxylgruppe besteht (Beinert und Kennedy 1989), resultierte ein an den der Dehydrogenasen angelehnter nicht radikalischer Mechanismusvorschlag (Scherf und Buckel 1993). Hierbei würde 4-Hydroxybutyryl-CoA zunächst analog zum Mechanismus der Dehydrogenasen mittels FAD in oxidierte Form zu 4-Hydroxycrotonyl-CoA oxidiert. Danach würde sich ein nukleophiler Angriff eines Hydridanions auf das α -Kohlenstoffatom des 4-Hydroxycrotonyl-CoAs ausgehend vom jetzt reduzierten FAD über eine S_N2' (Nukleophile Substitution mit Umlagerung von Doppelbindungen) Reaktion anschließen (Magid 1980). FAD wäre nun für den nächsten Zyklus reoxidiert und Vinylacetyl-CoA würde über die Δ^2, Δ^3 -Isomeraseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zum Produkt Crotonyl-CoA isomerisiert (Abbildung 5).

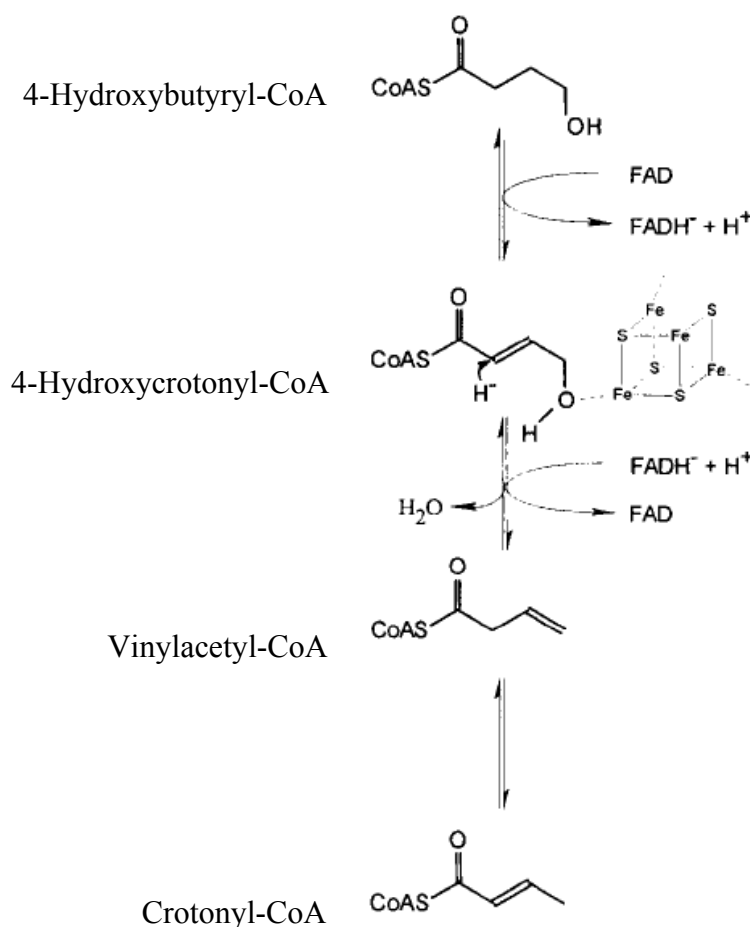


Abbildung 5. Hydridtransfer-Mechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Scherf und Buckel 1993)

Es konnte gezeigt werden, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ein Flavinsemiquinonradikal stabilisieren kann, dessen Spinkonzentration bei Substratzugabe zunimmt (Çinkaya 2002; Buckel und Golding 2006). Analog zu dem von Cornforth vorgeschlagenen radikalischen Mechanismus für Dehydrogenasen wurde von Buckel et al. ein radikalischer Mechanismus für die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase postuliert (Müh et al. 1997; Buckel und Golding 1999). Ergänzt wurde dieser durch die Modellierung des Substrats in die Kristallstruktur (Martins et al. 2004), die von einer Fixierung des Substrats am Thioestercarbonyl über H-Brückenbindungen mit der Ala460 N-H-Gruppe und der 2'-Hydroxylgruppe des Flavins ausgeht.

Hierbei wird analog zu Cornforth zunächst das aktivierte α -Proton, dessen pK durch die Nähe zu einem koordinierten Thioesterkarbonyl (Engst et al. 1999; Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b) auf ca. 8 gesenkt wurde, durch His292 abstrahiert. Diese Reaktion führt ebenso wie im Mechanismus über Hydridtransfer angenommen zum Enolat des Substrats. Nun kann eine

Einelektronen-Übertragung zum Flavin erfolgen, welches so vom Benzochinon zum Semichinonradikal reduziert wird (Abbildung 6). Das zuvor unaktivierte β -Proton (pK ca. 40) wird im daraus resultierenden Enoxy-Substratradikal nun auf pK 14 aktiviert (Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b). Durch zwei H-Brücken des Thioestercarbonyls (Ala-460-Rückgrad und 2'-Hydroxylgruppe des Flavins) wird der pK vermutlich weiter auf ca. 8 abgesenkt. Der Transfer eines β -Protons vom Substrat zum Flavin wandelt dieses in das neutrale Semiquinon um. Das daraus gebildete Ketylradikal-Substratintermediat kann nun die durch den [4Fe-4S]-Cluster polarisierte Hydroxylgruppe abspalten, wodurch ein Dienoxy-Substratradikal entsteht. Ein Proton wird hierbei vom Flavin wieder abgegeben und Wasser gebildet, woraus das Flavinsemichinonradikal-Anion regeneriert wird. Dieses reduziert das Substrat nun zum Dienolat und wird zum Flavinbenzochinon reoxidiert. Die γ -Protonierung des Dienolats ergibt Crotonyl-CoA, welches vom Enzym abgelöst wird (Abbildung 6).

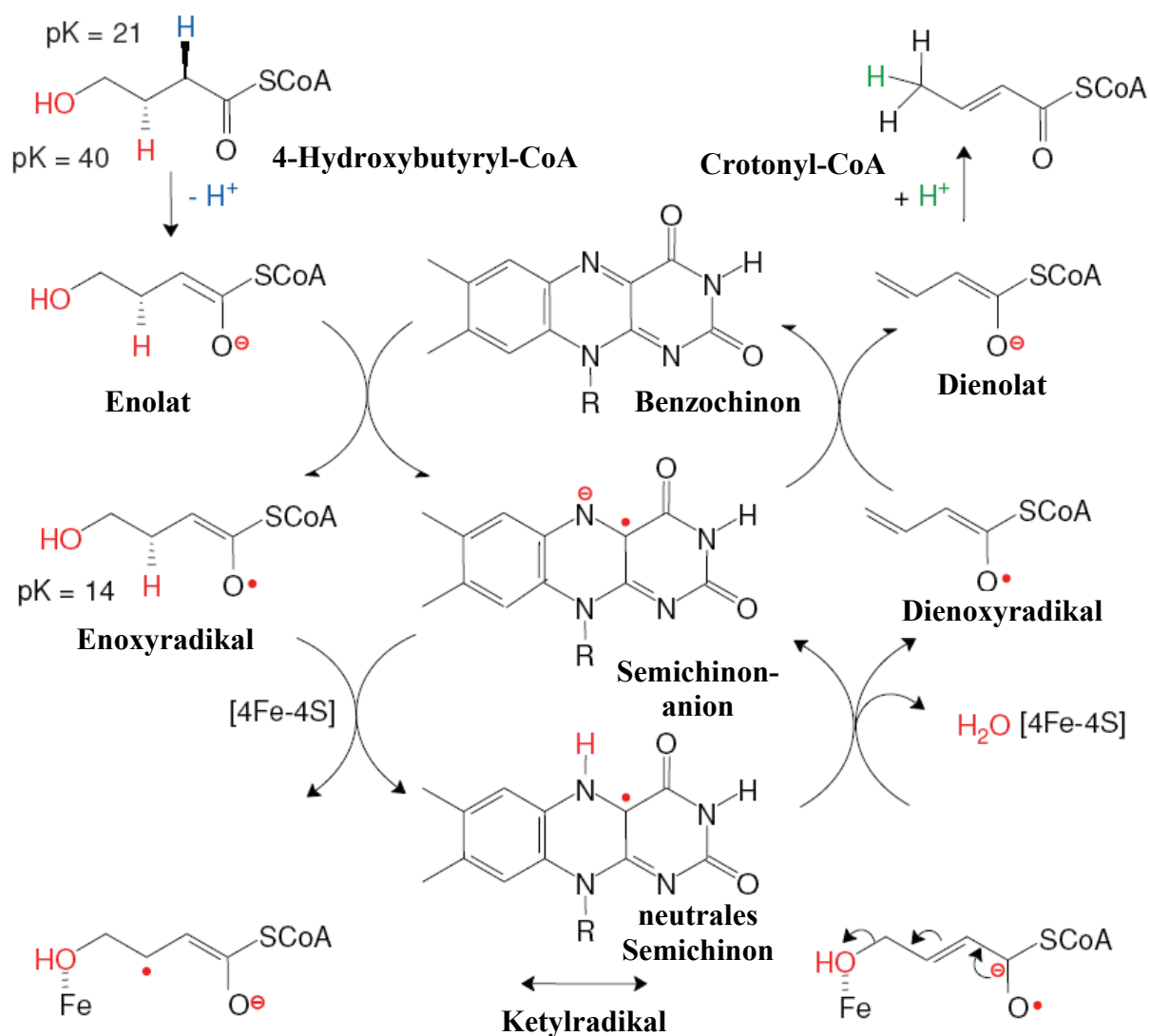


Abbildung 6. Radikalischer Mechanismus über Einelektronen- und Protonen-Transfer (Buckel und Golding 2006)

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Bestätigung des aus der Kristallstruktur postulierten Substratbindemodells. Dieses soll durch die vollständige Aufklärung der Stereospezifität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erreicht werden. Dazu werden organische Synthesen als Weg genutzt, um die fehlende Kokristallisation der Dehydratase mit Substraten zu ersetzen. Zusätzlich soll die Untersuchung der Rolle der Kofaktoren weitere Hinweise auf den bisher angenommenen Mechanismus liefern.

1.6.1 Stereoselektivität an C2

Eine Syntheseweg zu stereospezifisch markiertem enantiomerenreinem (*R*)- und (*S*)-4-Hydroxy[²H₁]butyryl-CoA soll entwickelt werden. Diese Substrate sollen zur Aufklärung der Stereospezifität 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bei der als initialen Schritt angenommenen Abstraktion des α -Protons dienen.

Mittels stereospezifisch markiertem [²H₁]Butyryl-CoA soll eine eventuelle Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität der Dehydratase nachgewiesen werden und sofern vorhanden deren Stereoselektivität mit der der Butyryl-CoA-Dehydrogenase verglichen werden.

1.6.2 Interaktion mit verschiedenen Substraten

Die schon bekannte Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase für das 3*Si*-Proton (Näser 2004) weist zusammen mit der Kristallstruktur (Martins et al. 2004) auf eine Interaktion des Substrats mit dem Flavinkofaktor hin. Diese Interaktion des Flavins mit dem Substrat während der Katalyse soll durch UV-Vis- und EPR-Spektroskopie mit verschiedenen Substraten näher untersucht werden.

Die postulierte Interaktion der Hydroxylgruppe des Substrats mit dem [4Fe-4S]²⁺-Cluster soll durch Mössbauer- und ENDOR-Spektroskopie nachgewiesen werden.

1.6.3 Stereochemie an C4

Zur Untersuchung der Stereospezifität der Abspaltung der Hydroxylgruppe und der anschließenden Reprotonierung zu Crotonyl-CoA soll ein Verfahren zur Synthese von (*R*)- und (*S*)-4-Hydroxy[4-³H, 4-²H₁]Butyryl-CoA entwickelt werden.

Sollte die Reaktion am C4 stereoselektiv sein, so wäre dies ein Hinweis auf eine Einschränkung der freien Drehbarkeit während der Katalyse. Neben der Koordination der Hydroxylgruppe durch den [4Fe-4S]²⁺-Cluster wäre dies ein Hinweis auf das postulierte planare Dienolatintermediat.

Zusammen mit kristallographischen Daten soll über die Analyse der chiralen Methylgruppe von Crotonyl-CoA gezeigt werden, von welcher Seite die finale Protonierung erfolgt, und somit einen Hinweis auf die dafür infrage kommenden Basen im aktiven Zentrum geliefert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

Clostridium aminobutyricum (*Clostridium spec.*, DSM 2634) wurde von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Die verwendeten *Escherichia coli* DH5 α und BL21 wurden von Eppendorf (Vertrieb GmbH, Deutschland)(DH5 α) und Stratagene (La Jolla, Californien, USA; BL21-CodonPlus(DE3)-RIL Stamm) bezogen.

2.2 Expressionskonstrukte

Die Plasmide zur Produktion der Malat-Synthase aus *E. coli* wurden von der Arbeitsgruppe Prof. S. James Remington (Institute of Molecular Biology and Departments of Chemistry and Physics, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403) zur Verfügung gestellt (Howard et al. 2000).

2.3 Medien für Anzucht von Organismen

2.3.1 Anzucht von *Clostridium aminobutyricum* mit Selektivmedium

Das hier verwendete Medium für die Anzucht von *C. aminobutyricum* nach (Hardman 1962) wurde nach (Willadsen und Buckel 1990) modifiziert.

Je 50 ml Medium wurde in 120 ml Serumflaschen abgefüllt und luftdicht verschlossen. Anaerobisieren des Mediums erfolgte durch Erhitzen (95 °C, 15 Minuten) im Wasserbad, Entgasen bei reduziertem Druck (30 mm Hg) bis zum Abkühlen und anschließendem dreimaligem Gasphasenwechsel mit Stickstoff. Danach wurde mit Stickstoff ein Überdruck (30 kPa) angelegt und autoklaviert (121 °C, 30 Minuten, 100 kPa Überdruck). Resazurin diente zur Kontrolle als Sauerstoffindikator.

Für die Stammhaltung wurde 10 prozentig angeimpft und für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Kulturen konnten danach 4-6 Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Für 500 ml:		Konzentrationen im Medium:
KH ₂ PO ₄	0,65 g	50 mM Kaliumphosphatpuffer insgesamt
K ₂ HPO ₄	3,55 g	
NaHCO ₃	1,00 g	24 mM
Hefe-Extrakt	1,50 g	3 mg / ml
γ-Aminobutyrat	5,00 g	97 mM
MgCl ₂ × 6H ₂ O	0,10 g	
FeCl ₃ × 6H ₂ O	0,005 g	
CaCl ₂ × 2H ₂ O	0,005 g	
MnSO ₄ × H ₂ O	0,5 mg	
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,5 mg	
Cysteinhydrochlorid × H ₂ O	0,25 g	
Na ₂ S ₂ O ₄	0,175 g	
Resazurin (Na-Salz) 0,2%	200 µl	

Die Feuchtzellen für die Enzymreinigungen wurden im 100 Liter Fermenter gezogen. Hierfür wurde das Medium direkt im Fermenter autoklaviert und durch Begasen mit Stickstoff anaerobisiert. Als Vorkultur diente 10 Liter stationäre Kultur, die einen Tag zuvor angeimpft worden war.

2.3.2 LB-Medium

LB-Medium wurde für die Kultivierung von *E. coli* verwendet. Eventuelle Zusätze sind in den entsprechenden Abschnitten vermerkt.

Medium für 1 l:

10 g Trypton
2,5 g Hefeextrakt
2,5 g NaCl
0,5 g Glucose

Für LB-Agar zusätzlich 20 g Agar pro Liter Medium zugeben. Das Medium wurde vor Gebrauch autoklaviert.

2.4 Allgemeine biochemische Analysen

2.4.1 Eisenbestimmung mit Ferene

Zur Eisenbestimmung von Proteinlösungen muss dieses zunächst durch Behandlung mit Salzsäure aus Komplexen mit dem Protein gelöst werden. Überschüssige Säure wird nun mit Ammoniumacetat neutralisiert und Fe^{3+} mit Ascorbinsäure zu Fe^{2+} reduziert. Danach wird präzipitiertes Protein durch Natriumdodecylsulfatlösung (SDS-Lösung) komplexiert. Nun kann durch Zugabe eines Eisenchelators (**Ferene**: 3-(2-Pyridyl)-5,6-bis(5-sulfo-2-furyl)-1,2,4-triazin, Dinatriumsalz Trihydrat) die Bildung eines blauen Komplexes bestimmt werden. Als Eisenstandard wurde eine frisch angesetzte Lösung von Mohrschem Salz $((\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O})$; 0,2 mM, 8,0 mg / l) 2 mM Dithiothreitol und 1 M Ammoniumsulfat verwendet.

Drei unbekannte Proben (5, 10, und 20 μl), zwei Blindproben und vier Eisenstandardproben (10, 25, 50, 100 μl , entsprechend je 2-20 nmol Eisen) wurden auf 100 μl mit Wasser verdünnt. Nach Zugabe von 100 μl Salzsäure (1 % w/v) wurden die Proben leicht geschüttelt. Nun wurden die Proben erhitzt (80 °C, 10 Minuten) und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt (10 Minuten). Zu jeder Probe wurden nun nacheinander 500 μl Ammoniumacetatlösung (7,5 % w/v), 100 μl Ascorbinsäure (4 % w/v, frisch ansetzen), 100 μl SDS-Lösung (2,5 % w/v) und zuletzt 100 μl Eisenchelator (1,5 % w/v) auf 1 ml Endvolumen zugegeben und nach jeder Zugabe gut gemischt. Die Proben wurden nun zentrifugiert (Tischzentrifuge von Eppendorf, 13000 Upm, 5 Minuten) und der Überstand bei 593 nm gemessen.

2.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit dem BioRad-Mikroassay durchgeführt (BioRad, München). Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliantblau R-250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an saure und basische Aminosäurereste des Proteins (Bradford 1976).

Die Testlösung wurde vor Gebrauch 1 zu 5 Verdünnt. Für den Testansatz wurden 20 μl einer Proteinlösung mit 200 μl Farbstofflösung in einer Mikrotiterplatte gemischt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA; 0,2 mg / ml). Von diesem wurde für eine Calibrierung eine

steigende Verdünnung (bis 1 zu 32) angefertigt. Der Test hat einen Messbereich von 0 bis 2 µg Protein, so dass die zu bestimmende Proteinprobe gegebenenfalls verdünnt werden muss. Die Messung erfolgte direkt nach Zugabe der Farbstofflösung in einem MR XII Photometer von (Dynex Technologies GmbH, Berlin) bei 595 nm.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Reinheit von Proteinpräparationen wurde mit der Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) bestimmt. Die Durchführung erfolgte in einer Mini Protean II-Elektrophoreseapparatur (BIO-RAD, München). Als Molmassenstandard wurde eine Mischung aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa) verwendet.

Komponenten	Trenngel (15 % Acrylamid)	Sammelgel (5,5 % Acrylamid)
Wasser	405 µl	2,4 ml
Acrylamid 30 %	4,5 ml	641 µl
1 M Tris/HCl	3,42 ml (pH = 8,8)	368 µl (pH = 6,8)
TEMED 5 %	99 µl	32 µl
Glycerin	450 µl	
APS (10 ng / ml)	126 µl	63 µl

Zum Denaturieren werden die Proben mit gleichem Volumen Probenpuffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % Glycerin, 10 % β -Mercaptoethanol, 4 % SDS und 0,25 % Bromphenolblau) versetzt und für 15 Minuten bei 95 °C erhitzt. Danach werden die Proben kurz zentrifugiert (30 Sekunden, 13000 Upm) und 5 µl jeder Probe und des Massenstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bis zum Erreichen des Trenngels bei 100 V und dannach bei 200 V (Mini Power Pack P 20, Biometra, Göttingen) solange bis der Bromphenolblau-Marker soeben aus dem Gel herausgewandert war.

Die Färbung erfolgte mit einer 0,06 % (m/v) Lösung von Coomassie Brilliantblau R-250 in Methanol/Wasser/Eisessig (5:4:1, v/v/v) nach Erhitzen auf 80 °C für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurde nicht gebundener Farbstoff mit einem Wasser/Eisessig/Ethanol (17,5:1:1,5, v/v/v)-Gemisch solange entfernt bis eine zufriedenstellende Färbung der Proteine ohne Hintergrund erreicht war.

2.5 Enzymreinigungen

Sofern nicht anders vermerkt wurden alle Säulenchromatographien in Enzymreinigungen mit Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) an einem FPLC-System der Firma Amersham Pharmacia Biotech (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) durchgeführt.

2.5.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*

Die Reinigung der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde erstmals 1993 beschrieben (Scherf und Buckel 1993). Im Folgenden wird das modifizierte in dieser Arbeit verwendete Protokoll dargestellt.

Alle Lösungen werden vor Gebrauch gefiltert (0,2 µm Porendurchmesser) und danach wie oben beschrieben anaerobisiert (Abschnitt 2.3.1). Alle weiteren Arbeiten erfolgten im Anaerobenzelt. Dort wurden vor Gebrauch sowohl die Puffer für 24 Stunden gerührt als auch alle verwendeten Kunststoffmaterialien für 24 h gelagert. Kurz vor Gebrauch wurden die Reduktionsmittel (Dithiothreitol, Natriumdithionit) zugegeben.

Je 20 g Feuchtzellen wurden in 80 ml 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,4), das Natriumdithionit (3,5 mg) als Reduktionsmittel und DNaseI (1 mg) zum Abbau genomischer DNS enthielt, suspendiert. Dann wurde die Zellsuspension mit Ultraschall auf Eis (Branson Sonifier / 50% duty-cycle; 7 output control; 4 × 8 Minuten mit 10 Minuten Pausen zwischen den Zyklen) aufgeschlossen. Der zellfreie Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation von Zelltrümmern befreit (100.000 × g für 60 Minuten) und anschließend filtriert (Porengröße 0,45 µm). Der so gewonnene Rohextrakt wurde auf eine DEAE-Sepharose-Säule (60 ml Säulenvolumen) aufgetragen und in 50 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4 mit 2 mM DTT und einem 420 ml Gradienten von 0 M bis 0,4 M Ammoniumsulfat eluiert. Die meiste Aktivität fand sich von 55% bis 67% des Gradienten.

Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereinigt und deren Ammoniumsulfatgehalt auf 1 M eingestellt, bevor die weitere Reinigung auf einer Phenyl-Sepharose-High-Load-Säule mit 60 ml Säulenvolumen erfolgte. Bei einem Gradienten von 420 ml und 1 M Ammoniumsulfat bis 0 M Ammoniumsulfat in 50 mM Kaliumphosphat und 2 mM DTT bei pH 7,4 fand sich die meiste Aktivität nach 69 % bis 80 %.

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert und auf Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität getestet. Obwohl die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase auf einem SDS-PAGE-Gel zu 95 % rein erschien, konnte in der Proteinlösung Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität nachgewiesen werden. Mittels des im Nachfolgenden beschriebenen

Reinigungsschritts konnte jedoch eine Abtrennung der Dehydratase- von der Dehydrogenaseaktivität erzielt werden.

Die weitere Reinigung der Proteinkonzentrate erfolgte über eine UNOQ-6R-Säule (6 ml Säulenvolumen, Biorad). Für ein optimales Funktionieren der Säule nach längerer Lagerung wurde die Säule zunächst voräquilibriert. Dazu wurden je 6 Säulenvolumen an Wasser, Niedrigsalzpuffer (nach Herstellervorschrift: 20 mM Tris/HCl; pH 6,8), Hochsalzpuffer (20 mM Natriumphosphat, 1 M NaCl; pH 6,8) und erneut Niedrigsalzpuffer durch die Säule geleitet, bevor mit dem für die weitere Reinigung genutzten Niedrigsalzpuffer (20 mM Natriumphosphat; pH 6,8) äquilibriert werden konnte.

Die Proteinlösung wurde zunächst durch dreimaliges Ankonzentrieren auf 200 µl (30 kDa Centrikon-Konzentrator) und Verdünnen auf 4 ml mit 20 mM Natriumphosphat pH 6,8 entsalzt, bevor die Probe in 1 ml Volumen auf die Säule aufgetragen wurde. Ein gestufter Gradient von 0 M bis 0,3 M bis 18 ml des Gesamtvolumens, von 0,3 M bis 0,65 M bis 72 ml des Gesamtvolumens und von 0,65 M bis 1 M bis zum Gesamtvolumen von 90 ml Natriumchlorid in 20 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,8 ergab eine vollständige Trennung der Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität von der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrataseaktivität. Die Fraktionen der beiden Enzyme wurden konzentriert und bei -80 °C gelagert. Jedoch wurde dieser zusätzliche Reinigungsschritt erst nach den Untersuchungen auf die Stereoselektivität der Dehydratase mit (S)-[2-²H₁]Butyryl-CoA (Abschnitte 2.10.2 und 2.10.3; Ergebnisse, Abschnitt 3.3) auf alle weiteren Experimente angewandt und alle nachfolgenden Untersuchungen mit so gereinigter 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (ohne Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität) durchgeführt.

2.5.2 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Clostridium aminobutyricum*

Die Reinigung der 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wurde von Hardman 1962 erstmals beschrieben und von Gerhardt 2000 modifiziert (Hardman 1962; Gerhardt et al. 2000). Im Folgenden wird das in dieser Arbeit verwendete Protokoll dargestellt.

Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch ultrafiltriert (0,2 µm Porengröße). Es wurde aerob gearbeitet. 10 g Feuchtzellen wurden in 30 ml 50 mM Tris/HCl bei pH 7,4 mit 0,1 mM EDTA und 1 mg DNaseI durch Ultraschall auf Eis (BransonSonifier / 70% duty-cycle, 7 Output control) in vier Zyklen von je 3 Minuten mit 5 Minuten Pause aufgeschlossen. Der zellfreie Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation von Zelltrümmern befreit (100.000 × g für 60 Minuten) und anschließend filtriert (Porengröße 0,45 µm). Der so gewonnene Rohextrakt

wurde auf eine DEAE-Sepharose Säule mit 60 ml Säulenvolumen aufgetragen und in einem Gradienten von 350 ml und 0 mM bis 650 mM Ammoniumsulfat in 50 mM Tris/HCl bei pH 7,4 eluiert. Die meiste Aktivität wurde in den Fraktionen bei 13 % bis 29 % des Gradienten gefunden. Die weitere Reinigung erfolgte auf einer Phenyl Sepharose Säule mit 60 ml Säulenvolumen. Bei einem Gradienten in 50 mM Tris/HCl bei pH 7,4 von 1 M bis 300 mM Ammoniumsulfat über 0 bis 100 ml und von 300 mM bis 10 mM über 100 ml bis 400 ml eluierte die meiste Aktivität bei 18 % bis 22 % der Ammoniumsulfatkonzentration.

Vor der weiteren Reinigung auf einer Phenyl Sepharose High Load Säule (60 ml Säulenvolumen) wurden die Fraktionen mit der höchsten Aktivität vereinigt und deren Ammoniumsulfatgehalt auf 1 M eingestellt. Bei einem Gradienten in 50 mM Tris/HCl bei pH 7,4 von 1 M bis 300 mM Ammoniumsulfat über 0 ml – 100 ml und von 300 mM bis 10 mM über 100 ml – 400 ml eluierte die meiste Aktivität bei 16 % bis 22 % der Ammoniumsulfatkonzentration. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert (Amicon-Konzentrator, 10 kDa Porengröße; Witten, Deutschland) und bei –21°C gelagert (spezifische Aktivität 83,74 U / ml; 4,18 U / mg).

2.5.3 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus *Clostridium aminobutyricum*

Für die Reinigung der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus *C. aminobutyricum* wurde ein bestehendes Protokoll modifiziert (Scherf und Buckel 1991). Alle nötigen Schritte wurden aerob bei 4°C durchgeführt. Für den Zellaufschluss wurden 30 g Feuchtzellen in 60 ml Aufschlusspuffer, der 50 mM Kaliumphosphat mit 10 mM MgCl₂ und 0,6 mg DNaseI bei pH 6,8 enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden durch drei Passagen mit einer AMICO French Pressure Cell Press (American Instrument Company – Division of Travenol Laboratories, Inc., Maryland, USA) bei einem Druck von 70 MPa lysiert und anschließend zentrifugiert (130.000 × g, 60 Minuten). Der Überstand wurde durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bei 55 % bis 80 % Sättigung fraktioniert und anschließend zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 22 ml 50 mM Kaliumphosphat mit 1,5 M Ammoniumsulfat bei pH 6,8 gelöst und auf eine Phenylsepharosesäule (5 × 4 cm, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) aufgetragen. Diese wurde zuvor im selben Puffer äquilibriert (50 mM Kaliumphosphat, 1,5 M Ammoniumsulfat). Die Elution erfolgte in einem abnehmenden Ammoniumsulfatgradienten von 360 ml von 1,5 bis 0 M Ammoniumsulfat in 50 mM Kaliumphosphat bei pH 6,8, gefolgt von 370 ml 50 mM Kaliumphosphat bei pH 6,8 ohne Ammoniumsulfat mit einer Flussrate von 3 ml pro Minute. Die Fraktionen, welche

Enzymaktivität enthielten (97 ml Gesamtvolumen), wurden vereinigt und ankonzentriert (Amicon-Konzentrator, 10 kDa Porengröße; Witten, Deutschland). Im folgenden Schritt wurde die Enzymlösung über eine DEAE-Sephacel-Säule ($5 \times 7,5$ cm, Pharmacia) gereinigt. Nach Auftragen der Enzymlösung in 50 mM Kaliumphosphat bei pH 6,8 wurde die Säule zunächst mit 100 ml dieses Puffers gewaschen und danach das Enzym über einen 360 ml Gradienten von 0 bis 400 mM Kaliumphosphat bei pH 6,8 gefolgt von 10 ml 1 M Kaliumphosphat im selben Puffer bei einer Flussrate von 3 ml pro Minute. Die aktiven Fraktionen wurden ankonzentriert. Auf eine Reinigung über eine Superdex 200 HiLoad 26 / 60 Säule wurde abweichend von (Scherf und Buckel 1991) verzichtet. Die auf diese Weise gereinigte Transferase enthielt noch Verunreinigungen an Phosphotransacetylase. Diese führt bei der Synthese von CoA-Estern und Enzymaktivitätsmessungen in Kaliumphosphatpuffer zu unerwünschter CoA-Esterhydrolyse. Deshalb wurde ein weiterer Reinigungsschritt über eine MonoQ-Säule (GE Healthcare) analog zu (Scherf und Buckel 1991) unternommen. Die vorliegende Proteinlösung wurde zunächst durch viermaliges Ankonzentrieren auf 200 μ l (30 kDa Centrikon-Konzentrator) und Verdünnen auf 4 ml in 20 mM Natriumphosphat bei pH 6,8 entsalzt, bevor die Probe in 1 ml Volumen auf die Säule aufgetragen wurde.

Die MonoQ-Säule (6 ml Säulenvolumen) wurde ähnlich wie zuvor die UNOQ-Säule (Abschnitt 2.5.1) zuerst vorequibriert (jeweils 5 Säulenvolumen) mit H_2O , dann mit Niedrigsalzpuffer (nach Herstellervorschrift: 20 mM Tris/HCl; pH 6,8), dann mit Hochsalzpuffer (20 mM Natriumphosphat, 1M NaCl; pH 6,8) und zuletzt wieder mit Niedrigsalzpuffer. Dieses Vorgehen ist nur nötig, wenn die Säule länger nicht benutzt wurde, und verbessert deren Trennschärfe und Bindungskapazität. Nun konnte mit dem für die Reinigung verwendeten Niedrigsalzpuffer äquilibriert werden.

Die entsalzene Proteinlösung wurde aufgetragen und in einem abgestuften Gradienten in 20 mM Natriumphosphat bei pH 6,8 von 0 ml bis 12 ml ohne NaCl, danach bis 82 ml Gesamtvolumen von 0 mM bis 300 mM NaCl eluiert. Die meiste Aktivität an Transferase wurde bei 42 ml bis 48 ml des Gradienten gefunden, die meiste Aktivität an Phosphotransacetylase dagegen von 46 ml bis 50 ml. Die Fraktionen von 42 ml bis 44 ml wurden vereinigt, ankonzentriert und bei -21°C gelagert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die vereinigten Fraktionen keinerlei Phosphotransacetylaseaktivität mehr aufwiesen.

2.5.4 Reinigung von Crotonase aus Rinderleber

Die Reinigung von Crotonase aus Rinderleber wurde von (Steinman und Hill 1975) beschrieben und in dieser Arbeit verwendet. Allerdings wird nach der Aceton Präzipitation auf eine Dialyse verzichtet und keine Chromatographie über DEAE-Sepharose verwendet.

Aufschluss / Rohextrakt: 250 g einer frisch geschlachteten Rinderleber (Schlachthaus, Enders GmbH & Co. KG, Marburg-Werda) wurden zerkleinert und in Aufschlusspuffer (0,2 M Kaliumbicarbonat, 0,05 M 2-Mercaptoethanol; pH 8,2) gegeben. Nun wurde im Ultra Turrax®-Mixer (IKA Labortechnik) auf Eis zerkleinert (2 × 5 Minuten mixen, dazwischen 10 Minuten Pause) und nach Zugabe von 330 ml Aufschlusspuffer für weitere 5 Minuten bei niedrigerer Geschwindigkeit gerührt. Das Homogenisat wurde unter Verwendung einer Wasserstrahlpumpe durch einen mit Gaze ausgelegten Büchnertrichter passiert. Das Filtrat wurde zentrifugiert (5200 Upm, 60 Minuten, 2 °C, 7120 g), der Überstand dekantiert und mit kaltem Aufschlusspuffer ad 0,6 Liter Volumen pro 250 g Leber aufgefüllt.

Säure- / Hitzebehandlung: Zu 0,6 Liter des Rohextrakts wurden 48 ml 1 M K_2HPO_4 zugegeben und danach mit 0 bis 4 °C kaltem Wasser ad 3 Liter aufgefüllt. Die Lösung wurde nun mit 150 ml 1 M Essigsäure langsam über 10 Minuten bei 4 °C unter Rühren von pH 7,5 auf pH 5,5 eingestellt. Für die Hitzefällung wurde der Extrakt im Wasserbad zunächst über 20 Minuten bis auf 49 °C erhitzt und dann innerhalb von 3 Minuten auf 51 °C gebracht. Die ca. 3,5 Liter des Extrakts wurden auf 0 °C abgekühlt. Sobald 15 °C unterschritten wurden, wurde mit ca. 500 ml 1 M Kaliumbicarbonat auf pH 7 neutralisiert. Eine anschließende Zentrifugation (5200 Upm, 20 Minuten, 2 °C, 7120 g) ergab ca. 3,5 Liter Überstand.

Aceton Präzipitation: 1,575 Liter Aceton wurde im Ethanol/Trockeneisbad auf -15 °C vorgekühlt. Das zur leichteren Handhabung in 2 Portionen à 1,75 Liter aufgeteilte Extrakt wurde nun auf -1 °C abgekühlt (Ethanol/Trockeneis), bevor portionsweise in Abständen von einer Minute langsam Aceton zugegeben wurde (5 × 50 ml). Während der Acetongabe wurde die Lösung kontinuierlich auf -3 °C abgekühlt, bevor das restliche Aceton bis zu einem Gesamtanteil von 31 % (v/v) zugegeben wurde. Die anschließende Zentrifugation (5200 Upm, 7120 × g, 20 Minuten, -6 °C) ergab ein Präzipitat, welches in 70 ml 0 °C bis 4 °C kaltem 0,02 M Kaliumphosphat mit 0,003 M EDTA bei pH 7,4 aufgenommen wurde. An dieser Stelle wurde die Reinigung nach (Steinman und Hill 1975) modifiziert. Es wurde keine Dialyse und keine weitere Reinigung mit einer DEAE-Zellulose Säule durchgeführt, sondern nur noch Ammoniumsulfatfraktionierung vor der abschließenden Kristallisation angewendet.

Ammoniumsulfatfraktionierung: (Im Folgenden wurde bei 4 °C im Kühlraum gearbeitet.)

Der Extrakt wurde zentrifugiert (9000 Upm, $13000 \times g$, 20 Minuten) und die Proteinkonzentration des Überstands mit 0,36 Liter 0,02 M Kaliumphosphat bei pH 7,4 auf ca. 15 mg pro ml verringert. Die 550 ml Lösung wurden nun mit 154 g pulverisiertem Ammoniumsulfat auf **40 %** Sättigung gebracht und zentrifugiert (5200 Upm, 7120 g, 25 Minuten, 3 °C). Die 550 ml Überstand wurden nun über 20 Minuten mit 99 g pulverisiertem Ammoniumsulfat auf **60 %** Sättigung eingestellt und für weitere 15 Minuten gerührt. Das Präzipitat der anschließenden Zentrifugation (5200 Upm, 7120 g, 25 Minuten, 3 °C) wurde in 20 mM Kaliumphosphat mit 3 mM EDTA bei pH 7,4 aufgenommen. (Optional: Für eine Reinigung über DEAE-Zellulose würden 75 ml 5 mM Kaliumphosphatpuffer, 2 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol verwendet werden.)

Kristallisation: Zu der bis kurz vor den Gefrierpunkt abgekühlten (Kältebad mit Trockeneis in Ethanol) Proteinlösung wurden dann ca. 7 ml (0,11 Anteile Volumen) Ethanol zugegeben, woraufhin Proteinkristalle auftraten. Erneutes Abkühlen im Kältebad erleichterte die Kristallisation. Das Enzym wurde direkt unter Kristallisationsbedingungen in Wasser / Ethanol mit einer Aktivität von 188 U pro ml (34,6 U / mg) gelagert. Der Reinheitsgrad und die Aktivität (Tabelle 1) waren für die Austauschexperimente in dieser Arbeit ausreichend, so dass auf eine weitere Reinigung verzichtet wurde.

Tabelle 1. Reinigunstabelle für die Crotonase aus Rinderleber.

	Aktivität [$\mu\text{mol} / \text{min}$]	Proteinmenge [mg]	spezifische Aktivität [U / mg]	Anreicherungsfaktor	Ausbeute in %
Rohextrakt	159600	32400	4.9	1	100%
Hitze/Säure Behandlung	122500	10850	11	2.2	77%
Acetonfällung	91350	4567.5	20	4.1	57%
Kristallisation	14476	415.8	35	7.1	9%

2.5.5 Produktion und Reinigung der Malat-Synthase aus *Escherichia coli*

Für die Produktion und Reinigung der Malat-Synthase aus *Escherichia coli* wurde ein Methode von (Howard et al. 2000) modifiziert. Das von Howard et al. zur Verfügung gestellte Plasmid pMSG-B enthielt eine Kopie des *glcB* Gens (amplifiziert aus *E. coli* W3110 genomischer DNA [Generelle Methode (Saiki et al. 1988)], das für eine 81 kDa monomere Version der Malat-Synthase (Molina et al. 1994) kodiert. Das Insert wurde mit NcoI und XhoI

in einen pET-28b Vektor (Novagen) ligiert, der einen Linker von *glcB* zu einer C-terminalen Hexahistidinesequenz zur Reinigung über Nickel-NTA-Affinitäts-Chromatographie enthält. Das Plasmid pMSG-B wurde in Wasser vom Filterpapier gelöst (37 µg / ml) und zur Amplifikation und Midi-Preparation in *E. coli* DH5α elektrotransformiert (2 µl Plasmid in 40 µl elektrokompenten Zellen). Nach 1 h Inkubation bei 37 °C in LB-Medium erfolgte die Selektion der positiven Transformanten auf Kanamycin-LB-Agar (50 µg / ml Kanamycin). Es wurde ein Kontrollverdau der Midi-Präparation von 5 ml über Nacht in Kanamycin-LB Medium gewachsener Kultur durchgeführt. Ein Doppelverdau mit NcoI und XhoI (Insert und Vektor) bzw. die Linearisierung des Vektors mit NcoI ergaben die korrekten Größen von Vektor (5,4 kB), Insert (2,3 kB) und linearisiertem Vektor mit Insert (7,7 kB). Nun wurde das Plasmid in den Expressionsstamm *E. coli* BL21 elektrotransformiert und nach Selektion erneut durch Midi-Preparation und anschließenden Kontrollverdau überprüft.

Die Produktion der Malate Synthase in *E. coli* BL21 pMSG-B erfolgte in LB-Medium mit Kanamycin (50 µg / ml, 5 l Medium). Eine Kolonie wurde von einer Agarplatte (LB, 50 µg / ml Kanamycin) in 5 ml Kultur (LB, 50 µg / ml Kanamycin) überimpft und bei 37 °C für 8 h inkubiert. Diese Kultur wurde dann zum Animpfen (10 %iges Inokululum) der Vorkultur, welche über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde, genutzt. Zur Produktion wurde LB-Kanamycin Medium 10 %ig inokuliert und bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen von OD₅₇₈ 0,5 wurde mit 1 mM IPTG induziert und anschließend für weitere 3,5 h bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde danach zentrifugiert (6000 Upm, 30 Minuten), der Überstand dekantiert und das Pellet in ein Falconröhrchen transferiert und erneut zentrifugiert (5000 Upm, 30 Minuten), um 4 g Feuchtzellen zu erhalten. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

Die Proteinreinigung erfolgte am nächsten Tag unter aeroben Bedingungen. Der Zellaufschluss von 4 g Feuchtzellen erfolgte in 10 ml 50 mM Kaliumphosphat bei pH 7 durch Ultraschall auf Eis (BransonSonifier / 60% duty-cycle, 7 Output control, 4 × 3 Minuten mit 5 Minuten Pause). Der zellfreie Extrakt wurde durch Ultrazentrifugation von Zelltrümmern befreit (100.000 x g für 60 Minuten) und anschließend filtriert (Porengröße 0,45 µm).

Der so gewonnene Rohextrakt wurde auf eine Nickel NTA Säule mit 25 ml Säulenvolumen aufgetragen und in einem Gradienten von 0 – 100 mM Imidazol in 50 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4 über 200 ml in 3 ml Fraktionen eluiert. Die meiste Aktivität eluierte bei 40–56 % des Gradienten. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt, ankonzentriert (Vivaspin-Konzentratoren, 30 kDa, von VivaScience – Sartorius group, Aubagne, Frankreich) und bei – 21°C gelagert (522 U / ml; 10,4 U / mg spezifische Aktivität).

2.6 Enzymaktivitätsbestimmungen

2.6.1 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Dieser Assay verfolgt die Bildung von NADH in stöchiometrischen Mengen zum verbrauchten 4-Hydroxybutyryl-CoA. 4-Hydroxybutyrat wird durch die 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase zu 4-Hydroxybutyryl-CoA umgesetzt. Nun erzeugt die Reaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase Crotonyl-CoA. Dieses wird zu (3S)-4-Hydroxybutyryl-CoA durch die Crotonase umgesetzt. Nun folgt die Reaktion zu Acetoacetyl-CoA durch die (3S)-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, wobei NADH aus NAD^+ gebildet wird. Die Acetyl-CoA-Acetyltransferase (Thiolase) spaltet Acetoacetyl-CoA unter Verbrauch eines freien CoASH zu zwei Acetyl-CoA. Eines davon wird genutzt, um über die Reaktion der Phosphotransacetylase mit inorganischem Phosphat Acetylphosphat zu bilden und CoASH zu regenerieren. Das Andere wird mit 4-Hydroxybutyrat zu 4-Hydroxybutyryl-CoA und Acetat umgesetzt (analog zur Synthese von chiraler Essigsäure, Abschnitt 2.21.2; Abbildung 20 A).

Die Zugabe von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erfolgte nach Präinkubation von ca. 5 Minuten nach Zugabe aller restlichen Komponenten, sobald die Reaktion der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase genügend Substrat für die Messung der Dehydratase unter substratsättigenden Bedingungen zur Verfügung gestellt hatte. Gemessen wurde die Bildung von NADH bei 340 nm ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Dawson et al. 1987).

Verwendete Lösungen	Eingesetzte Volumina	Konzentrationen im Testansatz
1 M KPP pH = 7,4	100 μl	100 mM
0,1 M EDTA	20 μl	2 mM
0,1 M DTE	20 μl	2 mM
0,1 M NAD^+	20 μl	2 mM
0,1 M Na 4-HB	10 μl	1 mM
0,01 M CoASH	10 μl	0,1 mM
0,01 M Acetyl-Phosphat	10 μl	0,1 mM
0,05 M Acetyl-CoA	10 μl	0,5 mM
120 U/ml 4-HB-CoA-Transf.	10 μl	1,2 U / ml
14 mg/ml "Enzympool"	20 μl	0,28 mg / ml
Ad 1 ml H_2O	770 μl	
+ 10 μl 4-HB-CoA-Dehydratase zum Starten der Reaktion		

Die Zugabe von Acetyl-CoA ist nicht notwendig, da es aus CoASH und Acetylphosphat regenerierbar ist, jedoch kann so die Präinkubationszeit verkürzt werden.

2.6.2 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

Eine bestehende Aktivitätsbestimmung wurde hierfür adaptiert (Hardman 1962). Dabei katalysiert die 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase die Umwandlung von 4-Hydroxybutyrat in Succinatsemialdehyd und die entsprechende Rückreaktion. NADH ist für die Rückreaktion CoSubstrat und wird dabei zu NAD^+ oxidiert.

Mengen im Ansatz	Konzentrationen im Test
50 μl 3mM NADH	0,15 mM
50 μl 1M Kaliumphosphat pH 7,0	50 mM
50 μl 360 mM β -Mercaptoethanol	18 mM
840 μl H_2O	ad 1ml
Start:	
50 μl 20 mM Succinatsemialdehyd	1,0 mM

Die Messung erfolgte bei 340 nm und die Abnahme der [NADH] ($\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) wurde beobachtet (Hardman 1962; Dawson et al. 1987).

2.6.3 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase

Hier wird die Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat durch Citrat-Synthase mit der Reaktion der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase gekoppelt. Ein modifizierter Testansatz nutzt die weite Substratspezifität dieses Enzyms (Scherf und Buckel 1991). Als Substrate werden dabei die CoA-Ester verschiedener Fettsäuren wie z.B. Butyryl-CoA und 4-Hydroxybutyryl-CoA, nicht jedoch Crotonyl-CoA, akzeptiert. Mit Acetat im Überschuss werden dabei Acetyl-CoA und Butyrat bzw. 4-Hydroxybutyrat gebildet. Das dabei freigesetzte CoenzymA reagiert mit DTNB, dessen Absorptionszunahme bei 412 nm verfolgt wird [Ellmans Reagenz: $\epsilon_{412} = 14,0 \text{ cm}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$ (Riddles et al. 1979; Riddles et al. 1983)].

Testansatz:	100 μl	1 M KPP pH 7,4
	20 μl	50mM DTNB (20 mg in 1 ml 300 mM KHCO_3)
	10 μl	0,1 M Oxalacetat
	10 μl	2 M Acetat
	10 μl	Probe
	10 μl	Citrat-Synthase (4,8 U) (1:10 verd., 9,81 mg / ml, 485 U mg, Sigma-Aldrich)
	10 μl	4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase

Der Anfangswert der Absorption wird vor Zugabe der Probe und der Citrat-Synthase gemessen. Die Änderung nach Probenzugabe bestimmt den Gehalt an freiem CoA. Die

weitere Änderung nach Zugabe der Citrat-Synthase bestimmt den Gehalt an Acetyl-CoA. Davon ausgehend bestimmt eine weitere Zunahme nach der Gabe von Acetat und 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase den Gehalt an 4-Hydroxybutyryl-CoA bzw. Butyryl-CoA.

Soll die Aktivität der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase bestimmt werden, so wird Butyryl-CoA im Überschuss zugegeben und die Absorptionsänderung nach Start der Messung mit Transferase gemessen.

2.6.4 Crotonase

Crotonase katalysiert die Hydratisierung von trans- α,β -ungesättigten Acyl-CoA-Derivaten zu den entsprechenden (*S*)- β -Hydroxyacyl-CoA-Thioestern (z.B. Crotonyl-CoA zu (*S*)-3-Hydroxybutyryl-CoA) (Stern und Campillo 1953; Wakil und Mahler 1954).

Testansatz:	100 mM KPP pH 7,4
	2 mM Crotonyl-CoA
	ad 1 ml H ₂ O
	Start mit Enzymprobe (10 μ l einer entsprechenden Verdünnung)

Gemessen wird die Veränderung der Absorption durch die Auflösung der konjugierten Doppelbindung des Crotonsäuresubstituenten am CoA bei 280 nm [$\epsilon_{280} = 3,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Steinman und Hill 1975)].

2.6.5 Malat-Synthase

Bei diesem Test wurde die Spaltung der Thioesterbindung von Acetyl-CoA bei der von Malat-Synthase katalysierten Kondensation mit Glyoxylat zu Malat bei 232 nm gemessen.

Testansatz:	50 mM Tris / HCl pH 7,6
	40 mM MgCl ₂
	0,2 mM Acetyl-CoA
	10 μ l Enzymprobe
	ad 1 ml Wasser
	Start mit 2 mM Glyoxylat (20 μ l 1M)

Danach wurde die Abnahme der Absorption bei 232 nm ($\epsilon_{232} = 4,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) verfolgt (Howard et al. 2000).

2.6.6 Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Die Oxidation von Butyryl-CoA zu Crotonyl-CoA durch die Butyryl-CoA-Dehydrogenase reduziert NAD^+ zu NADH. Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase hat jedoch keine Bindestelle für NAD^+ , so dass dem Test Ferricenium(III)hexafluorophosphat als künstlicher Elektronenakzeptor zugegeben wurde. Dabei werden pro Mol Butyryl-CoA 2 Mol Fe(III) zu Fe(II) reduziert.

Der Gehalt einer vor Gebrauch ultrafiltrierten Ferriceniumhexafluorophosphatlösung (30 mg pro 20 ml) in Salzsäure (10 mM) wurde photometrisch bestimmt ($\epsilon_{617} = 0,41 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) und diese im Testansatz entsprechend einer Konzentration von 200 μM zugegeben (Lehman et al. 1990; Lehman und Thorpe 1990).

Testansatz: 50 mM KPP pH 7,4
 200 μM Ferricenium(III)hexafluorophosphat
 ad 1 ml H_2O
 Start : 10 μl Dehydrataseprobe

Die Abnahme der Absorption bei 300 nm wurde verfolgt ($\epsilon_{300} = 4,3 \text{ mM}^{-1} \text{ mM}^{-1}$).

2.6.7 Aktivitätstest für die Rückreaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Transferase akzeptiert Crotonyl-CoA nicht als Substrat (Scherf und Buckel 1991). Darauf basierend misst dieser Test von der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus Crotonyl-CoA gebildetes 4-Hydroxybutyryl-CoA, welches dann analog zum Aktivitätstest der Transferase mit Acetat zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Dieses wird nun mit Oxalacetat durch Citrat-Synthase zu Citrat umgesetzt. Das dabei entstehende freie Coenzym A wird in der Anwesenheit von Ellmans-Reagenz bestimmt (Riddles et al. 1979; Riddles et al. 1983). Verfolgt wird die Absorptionzunahme bei 412 nm ($\epsilon_{412} = 14 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Dieser Test wurde auch zur Konzentrationsbestimmung von Crotonyl-CoA eingesetzt.

Testansatz: 50 mM KPP pH 7,4
 20 μl 50 mM DTNB (20 mg / ml + ca. 30 mg KHCO_3 / 300 mM)
 20 μl 2 M Natriumacetat (40 mM)
 10 μl 0,1 M Oxalacetat (1 mM)
 10 μl 25 mM Crotonyl-CoA (0,25 mM)
 10 μl Citrat-Synthase (4,8 U) (1:10 verd., 9,81 mg / ml, 485 U / mg, Sigma-Aldrich)
 10 μl (1,2 U) 4-Hydroxybutyryl-CoA-Transferase (120 U / ml)
 ad 1 ml
 Start: 10 μl 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

2.6.8 Aktivitätsassay der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bei 260 - 290 nm

Ein bestehender Test wurde hier modifiziert (Çinkaya 2002). Dieser Test ist nur für qualitative Bestimmungen der Aktivität geeignet, da die gemessenen Absorptionsänderungen unter denen lagen, die aufgrund der eingesetzten Substratmengen zu erwarten waren, und diese außerdem eine hohe Schwankungsbreite aufwiesen. Dies ist unverständlich, da die Substrate sich deutlich in ihren Absorptionskoeffizienten unterscheiden sollten. Es ist noch nicht geklärt, warum die maximale Absorptionsänderung stets geringer bestimmt wurde, als bedingt durch Gleichgewicht und Substratkonzentration möglich wäre. Dieser Test wurde deshalb nicht für die Routinemessungen der Aktivität der Dehydratase verwendet.

Gesättigte CoA-Ester absorbieren bei 259 nm hauptsächlich durch den Adeninanteil im Coenzym A-Rest ($\epsilon_{259} = 15,9 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Dawson et al. 1987). Bei α - β -ungesättigten CoA-Estern erhöht sich die spezifische Absorption bei 259 nm aufgrund der zusätzlichen Absorption der Doppelbindung ($\epsilon_{259} = 22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), sofern diese mit dem Thioestercarbonyl konjugiert. Die Reaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase fügt eine Doppelbindung (Crotonyl-CoA) in ihr zuvor gesättigtes Substrat (4-Hydroxybutyryl-CoA) ein. Die mit dem Umsatz verbundene Absorptionsänderung sollte bei 259 nm ($\Delta\epsilon_{259} = 6,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) mit auf 250 μM limitierter (durch zu geringe Transmission) oder bei 290 nm ($\Delta\epsilon_{290} = 2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) mit höherer maximaler Substratkonzentration messbar sein. Sowohl die Hin- (Testansatz **A**) als auch die Rückreaktion (Testansatz **B**) sollten hierbei bis zum Erreichen des Gleichgewichts (45:55; $K_{[4\text{-hydroxybutyryl-CoA/Crotonyl-CoA}]} = 1,23$) verfolgt werden können (Friedrich 2003). Aufgrund der Instabilität von 4-Hydroxybutyryl-CoA wird dieses in situ aus Acetyl-CoA und Natrium-4-Hydroxybutyrat hergestellt.

Testansatz A : 50 mM KPP pH 7,4 10 μl 25 mM Acetyl-CoA (250 μM) 10 μl 1 M Natrium-4-hydroxybutyrat (100 mM) 10 μl (1,2 U) 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase (120 U / ml) ad 1ml (H_2O) Start: 10 μl 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase
Testansatz B : 50 mM KPP pH 7,4 10 μl 25 mM Crotonyl-CoA ad 1ml (H_2O) Start: 10 μl 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Die Messung der Anfangsgeschwindigkeit muss rasch und mit ausreichend verdünnten Enzymproben erfolgen, da nach Erreichen des Gleichgewichts keine Absorptionsänderung mehr zu beobachten sein sollte. Ein Fehler durch die hohe Eigenabsorption der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Flavinkofaktor, [4Fe-4S]-Cluster) wird durch Verwendung verdünnter Proben minimiert.

2.7 Substratbestimmungen

2.7.1 Acetat

Hier wurde ein bestehendes Verfahren über Acetyl-CoA-Synthetase modifiziert (Lundquist 1974). Die Acetyl-CoA-Synthase verestert Acetat und freies CoenzymA unter Hydrolyse von ATP zu AMP. Myokinase wandelt nun das gebildete AMP mit weiterem ATP zu ADP um. ADP wiederum dient als Co-Substrat für die Reaktion der Pyruvatkinase mit Phosphoenolpyruvat, die ATP regeneriert. Gemessen wird der Verbrauch von NADH durch die Lactatdehydrogenase mit dem erzeugten Pyruvat unter Bildung von Lactat bei 340 nm. Dabei entspricht 1 Mol verbrauchtes NADH 2 Mol Acetat, die zur Acetyl-CoA Synthese verwendet wurden.

Testansatz:	710 µl Pufferbasis (100 mM Tris/HCl pH8; 100 mM KCl; 20 mM MgCl ₂) 50 µl CoenzymA (10 mM) 50 µl Phosphoenolpyruvat (PEP, 50 mM) 50 µl ATP (50 mM) 50 µl NADH (10 mM) 10 µl Lactatdehydrogenase (LDH, 11 U, Boehringer Mannheim) 10 µl Myokinase (1,4 U, Boehringer Mannheim) 10 µl Pyruvat Kinase (8 U, Boehringer Mannheim) Acetyl-CoA-Synthase (0,4 U, Sigma-Aldrich) 100 µl Acetatprobe (für Eichgerade 0 µM, 250 µM, 500 µM, 750 µM Natriumacetat, Stammlösung von 100 mM entsprechend verdünnt)
-------------	---

Der Start erfolgt mit der Probenzugabe. Die Absorption der Proben und des Standards wird zu mehreren Zeitpunkten (0 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten) gemessen. In der Regel ist die Reaktion nach 15 Minuten beendet. Der Test ist fehleranfällig, wenn eines der Enzyme nicht in ausreichender Aktivität zugegeben wird. Daher empfiehlt es sich, die verschiedenen Enzyme zu testen (insbesondere die in wässriger Lösung nur ca. 1-2 Monate lagerfähige Acetyl-CoA-Synthase).

2.7.2 4-Hydroxybutyrat

Es wurde eine Methode zur Bestimmung von (*R*)-2-Hydroxyglutarat (Buckel 1980b) bzw. (*S*)-Glutamat (Beutler und Michal 1974) verwendet und für die 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase modifiziert. Diaphorase wurde durch Meldolablauf ersetzt (Möllering et al. 1974). 4-Hydroxybutyrat wird hier zu Succinatsemialdehyd oxidiert und NAD^+ zu NADH reduziert. Meldolablauf überträgt Elektronen und Protonen von NADH auf Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT). Dessen Umwandlung in 1,3,5-Triphenylformazan kann bei 492 nm bestimmt werden.

Lösungen:	Meldolablauf 3,3 mg / 10 ml H_2O INT 35 mg / 50 ml H_2O 0,034 M NAD^+ [50 mg / 2 ml] TTE-Puffer pH = 8,8 -Triethanolaminhydrochlorid -1 M NaOH -Triton X 100 - H_2O 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase 1 mM 4-Hydroxybutyrat	für 100ml 9,3 g 42 ml 10 ml ad 100 ml
Testansatz:	200 μl TTE-Puffer pH = 8,8 50 μl Meldolablauf 60 μl 0,034M NAD^+ 50 μl INT 20 μl 4-Hydroxybutyrat-DH (1,5 U) 10 μl 4-Hydroxybutyratprobe (für Eichgerade 5 – 30 μl 1 M 4-Hydroxybutyrat) ad 1000 μl H_2O (für Eichgerade 630 – 600 μl)	

Die Messung erfolgte bei 37 °C und 492 nm. Die Absorption der Proben wurde zu verschiedenen Zeitpunkten verfolgt und so der Verlauf der Reaktion bis zum Ende (anhand der Eichgerade) abgewartet. Durchschnittlich nach 70 bis 90 Minuten war die Reaktion vollständig abgelaufen. Während der Messung wurde die Probe ohne 4-Hydroxybutyrat gegen die Probe mit 30 mM 4-Hydroxybutyrat gemessen und die Messung beendet, wenn keine weitere Änderung mehr stattfand. Die Eichgerade diente zur Bestimmung der unbekannten Probe. Der molare Extinktionskoeffizient von 1,3,5-Triphenylformazan beträgt $\epsilon_{492} = 19,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (Möllering et al. 1974).

2.7.3 Malat

Für die Konzentrationsbestimmung von Malat wurde eine modifizierte Version der Bestimmung von 4-Hydroxybutyrat verwendet. Die 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase wurde gegen Malatdehydrogenase (0,5 U/Testansatz) ersetzt und die durchschnittliche Reaktionszeit lag bei 120 bis 150 Minuten.

2.8 Substratsynthesen

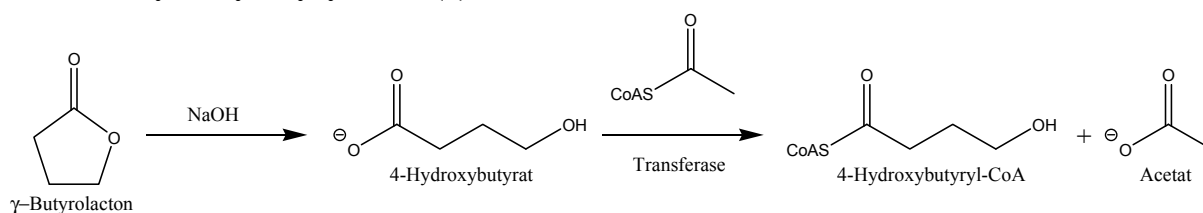
2.8.1 Acetyl-CoA (1), Butyryl-CoA (2) und Crotonyl-CoA (3) über Anhydride

Coenzym A (Trilithiumsalz, 25 mg, 30,45 μmol) wurde in Natriumhydrogencarbonat (0,2 M) gelöst. Zur Vermeidung von mehrfacher Addition der reaktiven Anhydride wurden diese vor Zugabe zur Coenzym A-Lösung mit Acetonitril verdünnt. Eine entsprechende Menge (1,2 faches molares Äquivalent, in Acetonitril) des jeweiligen Anhydrids (Essigsäureanhydrid, Buttersäureanhydrid, Crotonsäureanhydrid) wurde nun dazugegeben und inkubiert (Raumtemperatur, 10 Minuten). Nach 10 Minuten wurde ein Tropfen des Ansatzes auf ein Filterpapier zusammen mit DTNB [20 mg / ml] gegeben, um die vollständige Umsetzung zu überprüfen. Nachdem so kein freies CoA-SH mehr nachgewiesen werden konnte, wurde das Gemisch mit HCl auf pH 1,5 – 2 gebracht und über eine C18-Hydrophobe-Interaktionsäule (SepPakTM von Waters) entsalzt (siehe Abschnitt 2.8.2.1). Das Eluat wurde entsprechend enzymatisch (Abschnitt 2.6.3) bestimmten Konzentration portioniert, eingefroren (-80 °C) und lyophilisiert (Lyophilisator APLHA 1-4 LD, von der Firma CHRIST). Gelagert wurden die CoA-Ester bei -21°C. Anders als in „Die Aktivierte Essigsäure“ (Decker 1959) beschrieben findet bei der Synthese von Crotonyl-CoA keine nachweisbare Addition von freiem Coenzym A an die Doppelbindung des Crotonsäureanhydrids statt. Die enzymatischen Konzentrationsbestimmungen über 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Abschnitt 2.6.7) und über Kopplung mit der Crotonyl-CoA-Carboxylase aus *Rhodobacter sphaeroides* (Sebatian Koelzer, persönliche Mitteilung) sowie direkte Messungen der Absorption bei 260 nm ($\epsilon_{260\text{nm}} = 15,9 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Dawson et al. 1987) ergaben innerhalb einer Fehlertoleranz von 5-10 % gleiche Werte.

2.8.2 CoA-Ester-Synthesen über 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase

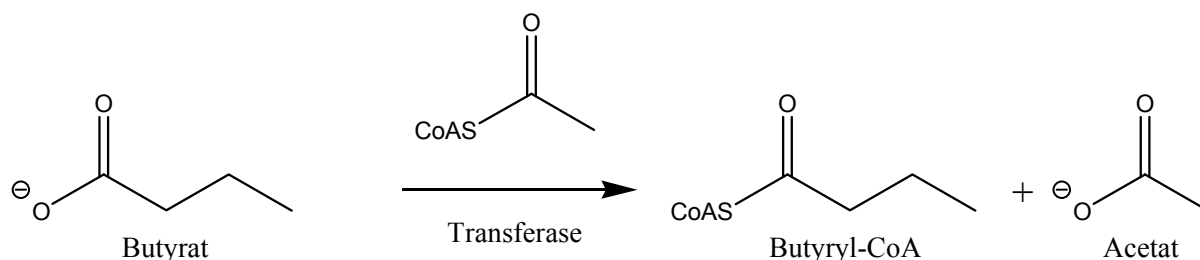
4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase kann verwendet werden, um verschiedene CoA-Ester zu synthetisieren. Dabei werden verschiedene CoA-Ester als Donoren akzeptiert (Butyryl-CoA, 4-Hydroxybutyryl-CoA, Acetyl-CoA, Vinylacetyl-CoA, etc., nicht jedoch Crotonyl-CoA) (Scherf und Buckel 1991). Diese CoA-Substrate werden mit 30 bis 50 fachem molaren Überschuss eines akzeptierten Fettsäuresalzes zu dem entsprechenden CoA-Ester umgesetzt.

2.8.2.1 4-Hydroxybutyryl-CoA (4)



4-Hydroxybutyrat ist das Substrat dieser Reaktion. Liegt dieses als Lacton vor, muss dieses zunächst gespalten werden. Dafür wurden 100 μ mol des Lactons in Wasser bei pH 11-12 für 5 Minuten inkubiert und dann neutralisiert. Nun wurde in 1 ml 100 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4 2,5 μ mol Acetyl-CoA und 5 U 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus *C. aminobutyricum* zugegeben für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Produkt 4-Hydroxybutyryl-CoA wurde über eine C18-Säule mit 0,1 % Trifluoressigsäure zum Äquilibrieren und Waschen und 50 % Acetonitril / 0,1 % Trifluoressigsäure zur Elution gereinigt. Das Produkt wurde bei -80 °C eingefroren, lyophilisiert und bei -21 °C gelagert.

2.8.2.2 Butyryl-CoA (5)



2,5 μ mol Acetyl-CoA und 30 mg Natriumbutyrat (0,27 mmol) wurden in 100 mM Kaliumphosphat bei pH 7.4 gelöst und mit 5 U 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Das so gebildete Butyryl-CoA wurde aus dem Reaktionsansatz über eine C18-Säule und Lyophilisation wie oben beschrieben isoliert und gelagert.

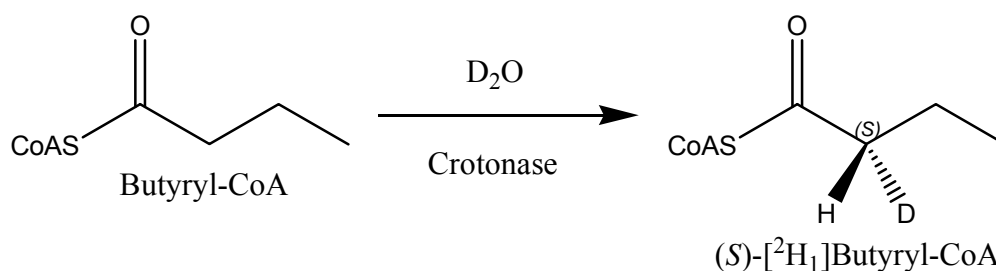
2.8.3 Herstellung und Analyse einer Markierung am C2 von Butyryl-CoA über Crotonase

Es wurde beobachtet, dass bei leicht erhöhtem pH-Wert von ca. 8,5 bis 8,8 Crotonase in der Lage ist, einen Austausch des α -Protons von Butyryl-CoA stereospezifisch in pro-*S*-Position gegen Protonen des umgebenden Wassers durchzuführen (D'Ordine et al. 1994). Dies wird im Folgenden benutzt, um entweder stereospezifisch eine Markierung ins Butyryl-CoA einzufügen oder eine aus anderer Quelle stammende Markierung in $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ auf ihre Stereokonfiguration zu testen.

Genutzt wurde dies für einen Vergleich von $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$, welches aus D- bzw. L-Methionin durch eine Modifikation der Synthese mit Raney-Nickel Katalysator synthetisiert wurde ((*S*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]$ Buttersäure (*S*-17), siehe Abschnitt 2.20.1), mit (*S*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ (*S*-5, erzeugt durch Crotonase).

Ebenfalls getestet wurde $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{-Butyryl-CoA}$ hergestellt in D_2O durch eine mit Butyryl-CoA-Dehydrogenase verunreinigte Präparation von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Abschnitt 2.10.3). Als Kontrolle dazu wurde (*S*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ (*S*-5), welches mit Crotonase in D_2O hergestellt worden war, mit dieser Enzympräparation in H_2O umgesetzt (Abschnitt 2.10.2).

Herstellung von (*S*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ (*S*-5)



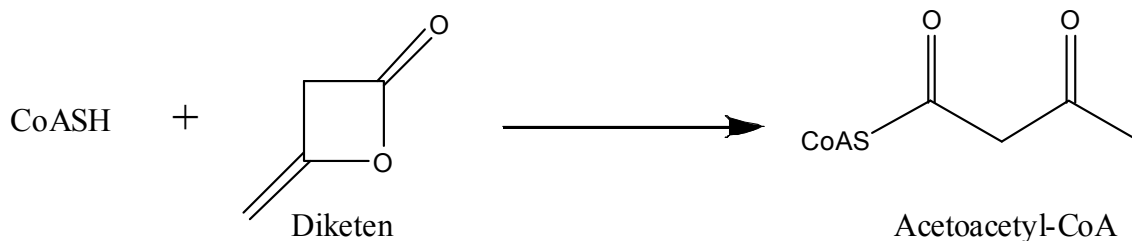
2,5 μmol Butyryl-CoA wurden in 100 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 8,5 in 1 ml Gesamtvolumen gelöst und für 48 h bei Raumtemperatur mit 10 U Crotonase inkubiert. Die Reaktion wurde in D_2O durchgeführt, um markiertes Substrat zu erhalten. Als Kontrolle auf spontanen Austausch wurde das Experiment ohne Enzym in D_2O bei pH 8,5 für 48 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Beide CoA-Derivate wurden über eine C18-Säule aufgereinigt und in MALDI-TOF-MS überprüft (87 % Austausch, $m/z = 839$ Da, 13 % unmarkiert, $m/z = 838$ Da).

Analyse von $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$

2,5 μmol $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ wurden in einem Gesamtvolumen von 1 ml in 100 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 8,5 gelöst und für 48 h bei Raumtemperatur mit 10 U Crotonase inkubiert. Die Reaktion wurde sowohl in D_2O als auch in H_2O durchgeführt. Als Kontrolle auf spontanen Austausch wurde das Experiment ohne Enzym in D_2O und H_2O bei pH 8,5 für 48 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle CoA-Derivate wurden über eine C18-Säule aufgereinigt und in MALDI-TOF-MS überprüft. Die Analyse der Masse der verschiedenen Butyryl-CoA-Proben gibt nun Aufschluss über die ursprünglich vorhandene Markierungen. Zusätzlicher Einbau eines Deuteriums in D_2O ohne Verlust in H_2O zeigt *R*-Konfiguration an, während ein Verlust in H_2O ohne Einbau in D_2O auf eine *S*-Konfiguration im analysierten $[^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ hinweist.

2.9 Inhibitorensynthesen

2.9.1 Acetoacetyl-CoA (6)

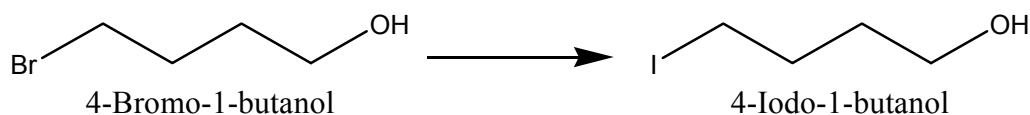


CoenzymA (Trilitiumsalz, 10 mg, 12,18 μmol) wurde in Wasser (2,93 ml) und Natriumhydrogenkarbonat (1 M, 666 μl) gelöst. Danach wurde eine Lösung von Diketen in Acetonitril (1,2 mg, 1,1 μl , 14,2 μmol , 1,2 molarer Überschuss, in 333 μl Acetonitril) zugegeben (Vorlage der Diketenlösung: 1,5 ml Acetonitril + 5 μl Diketen). Nach 30 Minuten Rühren bei Raumtemperatur erfolgte Ansäuern (pH 2) und Reinigung über eine C18-Säule. Die Charakterisierung des Produkts erfolgte mit UV-Vis ($\epsilon_{259\text{nm}} = 15,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Ausbeute 73 %, 8,9 μmol) und MALDI-TOF-MS ($m/z = 852 \text{ Da}$). Das Produkt wurde lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

2.9.2 3-Hydroxybutyryl-CoA (7)

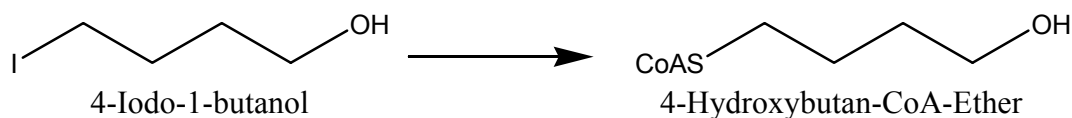
Acetoacetyl-CoA (**6**; 6,2 μmol) wurde in Wasser (250 μl) und Kaliumhydrogenphosphat (1M, 50 μl gelöst (pH 7-8). Eine Lösung von Natriumborhydrid (23,34 mg, 617 μmol) in Wasser (900 μl) und Kaliumhydrogenphosphat (100 μl , 1 M) wurde angesetzt und eine äquivalente Menge (10 μl , entspricht 0,23 mg, 6,2 μmol) davon zur CoA-Lösung gegeben. Die Reaktion wurde nach 20 Minuten bei Raumtemperatur durch Ansäuern (5 M HCl, ca. 8 μl \rightarrow pH 1,5) abgebrochen und über eine C18-Säule gereinigt. Das Produkt wurde lyophilisiert und bei -20 °C gelagert.

2.9.3 1-Iodo-4-butanol (**8**)



Eine Lösung von Natriumiodid (50 mmol, 7,5 g) in Aceton (50 ml) wurde hergestellt. 4-Bromo-1-butanol (100 mg, 80 μl 0,65 mmol) wurden in 2 ml dieser Natriumiodidlösung aufgenommen. Nach Rühren (10 Minuten, Raumtemperatur) wurde durch Zentrifugation (5 Minuten, 13000 Upm) weißes Natriumbromid als Präzipitat abgeschieden. Erneutes Zentrifugieren (5 Minuten, 13000 Upm) ergab einen klaren Überstand. Dieser wurde eingedampft, um das Produkt (290 mg, enthält noch Natriumbromid) zu erhalten.

2.9.4 4-Hydroxybutan-CoA-Ether (**9**)



CoenzymeA (15 mg, 18,3 μmol) wurde in Kaliumhydrogencarbonat (1 M, 1 ml) und Wasser (3,5 ml) gelöst. Krudes 1-Iodo-4-butanol (**8**; 50 mg, angenommene 100 % Ausbeute, 250 μmol) wurde in Acetonitril (0,5 ml) gelöst und für 16 h im Dunkeln unter Stickstoff bei Raumtemperatur gerührt. Die Reinigung erfolgte über C18-Säule (500 mg Säulenbett). Das Produkt wurde lyophilisiert und mit MALDI-TOF-MS ($m/z = 839$ Da) und UV-Vis-Spektroskopie ($\epsilon_{259\text{nm}} = 15,9 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Ausbeute 73 %) charakterisiert. Aliquots von je 2,5 μmol wurden bei -20 °C gelagert.

2.10 Analysen zur Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase am C2

Die Reaktion von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA, katalysiert von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *C. aminobutyricum*, wurde mit den in dieser Arbeit beschriebenen CoA-Ester Derivaten durchgeführt, um den Verbleib der verschiedenen Markierungen in den Substraten zu verfolgen. Eine Untersuchung zur initialen Protonenabstraktion in α -Position wurde mit (S)-[2- $^2\text{H}_1$]Butyryl-CoA (erzeugt durch Crotonase) durchgeführt.

2.10.1 Reaktion von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA

Aufgrund der Instabilität von 4-Hydroxybutyryl-CoA wurde dieses direkt vor der Reaktion mit Dehydratase durch Inkubation mit 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus Acetyl-CoA und 4-Hydroxybutyrat wie oben beschrieben hergestellt. Verbleibende aktive Transferase wurde anschließend durch Säurebehandlung für kurze Zeit (pH 2 bis 3, < 1 Minute) inaktiviert. Der Ansatz wurde geteilt und die Hälfte der Probe (1,25 μmol) neutralisiert und in 100 mM Kaliumphosphatpuffer bei pH 7,4 mit 6 U 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach über eine C18-Säule gereinigt. Der Rest des 4-Hydroxybutyryl-CoAs (1,25 μmol) wurde unbehandelt über eine C18-Säule wie oben beschrieben gereinigt und als Referenz verwendet.

Die gebildeten CoA-Ester wurden lyophilisiert und mit MALDI-TOF-MS analysiert. Je nach für die Synthese von 4-Hydroxybutyryl-CoA verwendetem Substrat wurden auf diese Weise (R)- und (S)-4-Hydroxy[$^2\text{H}_1$]Butyryl-CoA, ausgehend von 3-Benzoyloxypropan-1-ol und Methionin untersucht.

2.10.2 Reaktion mit (S)-[2- $^2\text{H}_1$]Butyryl-CoA

2,5 μmol des durch Crotonase erzeugten (S)-[2- $^2\text{H}_1$]Butyryl-CoA (S-5, 87 %, $m/z = 839$ Da, 13 % unmarkiert, $m/z = 838$ Da) wurden in 1 ml 100 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4 aufgenommen und mit 6 U 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach über eine C18-Säule wie oben beschrieben gereinigt.

Der Versuch wird unter exakt gleichen Bedingungen zur Kontrolle ohne 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase durchgeführt, um auf spontanen Austausch mit dem Lösungsmittel an der α -Position des Butyryl-CoA zu überprüfen. Die gleiche Abfolge von Reaktionen wurde in D₂O durchgeführt, um einen eventuellen Einbau von Deuterium in *R*-Position nachweisen zu können.

Die gebildeten CoA-Ester wurden lyophilisiert und mit MALDI-TOF-MS analysiert.

2.10.3 (*R*)-[2-²H₁]Butyryl-CoA (*R*-5) oder Reaktion mit Butyryl-CoA

Dieser Test dient dazu nachzuweisen, ob die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in α -Position von Butyryl-CoA eine Protonierung durchführen kann. 2,5 μ mol Butyryl-CoA gelöst in 1 ml 100 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4 in D₂O wurden mit 6 U 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach über eine C18-Säule wie oben beschrieben gereinigt und lyophilisiert für die Analyse mit MALDI-TOF-MS. Der Versuch wurde mit nur partiell gereinigter Dehydratase, die noch Dehydrogenaseaktivität enthielt, und mit reiner Dehydratase durchgeführt (siehe Abschnitt 2.5.1 zur Reinigung).

2.11 Ammonium-Lyaseaktivität der Dehydratase

Eine mögliche Ammonium-Lyaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase würde die Übertragung einer NH₂-Gruppe auf Crotonyl-CoA ($m/z = 836$ Da) unter Bildung von 3-Amino- oder wahrscheinlicher 4-Aminobutyryl-CoA ($m/z = 853$ Da) bedeuten. Die Verfügbarkeit von NH₄⁺ zur Übertragung auf Crotonyl-CoA wird bei verschiedenen pH-Werten getestet.

Die Reaktion wurde mit 2,5 μ mol Crotonyl-CoA in 100 mM Kaliumphosphat bei verschiedenen pH-Werten (7,5, 8,0 und 8,5) sowohl ohne Ammoniumsulfat als auch mit 100 mM Ammoniumsulfat für 20 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt und anschließend über eine C18-Säule gereinigt. Eine Analyse der zuvor von Acetonitril befreiten (Speed Vac, 30 Minuten) Proben erfolgte mit MALDI-TOF-MS.

2.12 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrischen Analysen der CoA-Derivate in dieser Arbeit wurden alle mit **Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time of Flight Massenspektrometrie** (MALDI-TOF-MS) durchgeführt. Dabei wurde an einem Voyager Spectrometer DE-RP (Applied Biosystems, Weiterstadt) gemessen. Es wurde im Reflektormodus mit einer verzögerten Extraktion und positiver Polarität gemessen. Die Beschleunigungsspannung betrug 20.000 V, die Gitterspannung lag bei 58 %. Die Verzögerungszeit betrug 50 ns. Die Ratio der Reflektorspannung betrug 1 zu 1,12. Es wurden durchschnittlich 0,5 Prozent der Beschleunigungsspannung am „guide wire“ angelegt. Der gemessene Massenbereich betrug 700 bis 1000 Da.

Als Matrix zur Übertragung der Laserenergie auf die Proben wurde 3-Hydroxy- α -cyanozimtsäure oder 4-Hydroxy- α -cyanozimtsäure genutzt. Alle Proben wurden vor den Messungen von organischen Lösemitteln (z. B. Acetonitril) befreit und eine Verdünnungsreihe (1:2 bis 1:16) mit 1 mM Ausgangskonzentration der CoA Ester in Matrix (gesättigte Lösung in 70 % Acetonitril in Wasser) direkt auf dem Probenträger angefertigt. Die Proben wurden durch Trocknen in Matrixkristalle eingeschlossen und im Hochvakuum gemessen.

2.13 Mössbauer-Spektroskopie – Effekte der Substratbindung

Die Analysen der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit Mössbauerspektroskopie wurden am Max-Planck Institut für bioanorganische Chemie in Mühlheim auf einem Spektrometer mit alternierender konstanter Beschleunigung durchgeführt. Die minimale experimentale Linienbreite betrug $0,24 \text{ mms}^{-1}$ (volle Breite bei halber Höhe). Die Probentemperatur wurde dabei entweder in einem Oxford Instruments Variox oder einem Oxford Instruments Mössbauer-Spectromag Kryostat konstant aufrechterhalten. Letzterer ist ein paarweise geteiltes supraleitfähiges Magnetsystem, in dem Magnetfelder von bis zu 8 T angelegt werden können, während die Probentemperatur im Bereich von 1,5 K bis 250 K variiert werden kann. Das Magnetfeld in der Probe steht dabei im rechten Winkel zur γ -Strahlung. Die $^{57}\text{Co/Rh}$ Quelle (1,8 GBq) wurde bei Raumtemperatur in einer Lücke des Magnetsystems in einer Nullfeld-Position untergebracht. Isomerverschiebungen werden relativ zu Eisen Metall bei 300 K angegeben.

Die bei Nullfeld gemessenen Spektren wurden mit Lorentzschen Dupletts angepasst. Die Spektren der im Magnetfeld durchgeführten Mössbauer Messungen des diamagnetischen Clusters ($S = 0$) wurden durch das übliche nukleare Hamiltonsche Verfahren für ^{57}Fe simuliert (Trautwein et al. 1991). Die zur Simulation verwendeten Spektren wurden bei einer Temperatur 4,2 K aufgenommen. Die Messungen mit externem Magnetfeld fanden bei einer Feldstärke von 7 T statt.

Zur Inkorporation von ^{57}Fe in die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde bei der Aufzucht von *C. aminobutyricum* Modifikationen am Medium [siehe Abschnitt 2.3.1 modifiziert nach (Müh et al. 1997)] vorgenommen. Das Komplexmedium zur Aufzucht von *C. aminobutyricum* enthält 15 μM ^{56}Fe im Hefeextrakt und 45 μM durch zugegebenes Eisenchlorid. Wird der Hefeextrakt zuvor mit Chelex-100 (Eisenchelator, Sigma) behandelt (Restkonzentration an ^{56}Fe ca. 5 μM) und kein FeCl_3 zugegeben, so kann durch Zugabe von 45 μM ^{57}Fe zusammen mit 0,4 mM Citrat eine 90 prozentige Anreicherung erzielt werden (Müh et al. 1997). Mit so behandeltem Medium konnten nur geringe Zellmengen (5 g pro 10 l Kultur) erhalten werden. Deshalb wurde unbehandelter Hefeextrakt verwendet und 45 μM ^{57}Fe ohne Citrat zugegeben um Zellen mit 75 % Anreicherung zu erhalten (15 g pro 10 l Kultur) (Müh et al. 1997).

Zellen von *C. aminobutyricum*, die in so mit ^{57}Fe angereichertem Medium gezüchtet worden waren, wurden aufgeschlossen und eine Enzymreinigung (siehe Abschnitt 2.5.1) durchgeführt. Die zum Anfertigen der Proben genutzte mit ^{57}Fe angereicherte 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase hatte eine Proteinkonzentration von 95 mg pro ml, eine spezifische Aktivität von 2,4 U pro mg und einem Eisengehalt von 0,025 bis 0,030 mM (14 bis 16 Fe pro Homotetramer).

Es wurden folgende Proben hergestellt:

1. 250 μl Enzym (wie gereinigt)
250 μl 50 mM KPP pH 7,4
2. 250 μl Enzym (wie gereinigt)
150 μl 50 mM KPP pH 7,4
100 μl Crotonyl-CoA (2,5 μmol) in KPP pH 7,4
3. 250 μl Enzym (wie gereinigt)
145 μl 50 mM KPP pH 7,4
100 μl Crotonyl-CoA (2,5 μmol) in KPP pH 7,4
5 μl Natriumdithionit (2 mM)

Die Proben wurden ca. 30 Sekunden nach dem Befüllen der Probenbehälter auf einem zuvor mit flüssigem Stickstoff gekühltem Metallblock eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert. Alle Proben wurden in einem anaeroben Zelt angefertigt. Sämtliche Gerätschaften wurden vor Gebrauch 24 h im Zelt gelagert. Alle Puffer und Lösungen waren anaerob.

2.14 EPR-Spektroskopie – Effekte verschiedener Substrate

Die EPR-Messungen wurden an einem X-Band-EPR-Spektrometer EMX-6/1 mit einer rechteckigen standard Kavität der Firma Bruker, gekühlt mit einem ER-4112HV Helium-Fluß Kryostaten der Firma Oxford Instruments, durchgeführt. Jede Probe enthielt 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (10 mg/ml, 3,6 U/mg) mit einer konstanten Substratkonzentration (5 mM). Eine Ausnahme hiervon bildeten die in situ generierten Substrate 4-Mercaptobutyryl-CoA und 4-Aminobutyryl-CoA, die entweder spontan aus 4-Mercaptobutyrolacton und CoASH oder durch 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus Crotonyl-CoA und Ammoniumsulfat gebildet wurden. Dabei diente die zugegebene Menge CoASH bzw. Crotonyl-CoA als Konstante. Hierbei wurden für 100 mM Ammoniumsulfat bzw. 100 mM 4-Mercaptobutyrolacton direkt zu den Proben gegeben. Im Gegensatz zu 4-Aminobutyryl-CoA (Abbildung 31, Abschnitt 3.9) konnte für 4-Mercaptobutyryl-CoA kein Nachweis mit MALDI-TOF-MS erbracht werden.

Die Photoreduktion der Proben erfolgte nach Substratzugabe in Anwesenheit von 1 mM Deazaflavin mit einem Diaprojektor für 3 Minuten auf Eis. Oxidation der Proben durch 5 mM Kaliumhexacyanoferrat(III) erfolgte vor Substratzugabe durch Inkubation für 5 Minuten bei 15 °C. Danach wurde das Kaliumhexacyanoferrat(III) über Centrikon-Konzentratoren (30 kDa Porengröße) durch fünfmaliges Ankonzentrieren auf jeweils 5-10% des Volumens und erneutes Verdünnen mit 50 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4 wieder aus den Proben entfernt. Die oxidierten Proben wurden nun mit Substrat versetzt und vor dem Einfrieren unterschiedlich lange bei Raumtemperatur inkubiert (1 Minute: Proben **I-V**, 10 Minuten: Proben **VI-X**). Alle photoreduzierten Proben wurden nach ca. 6-8 Minuten eingefroren.

Probenliste mit Messbedingungen: (200 µl Probenmenge)

- I.** CoASH, 1 Minute, oxidiert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
- IIa.** CoASH + Thiolacton, 1 Minute, oxidiert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
- IIb.** CoASH + Thiolacton, 1 Minute, oxidiert, 18 K, 20 dB, 2 Scans
- IIIa.** Crotonyl-CoA, 1 Minute, oxidiert, 10 K, 20 dB, 2 Scans

-
- IIIb.** Crotonyl-CoA, 1 Minute, oxidiert, 18 K, 20 dB, 2 Scans
 - IV.** Crotonyl-CoA + AS, 1 Minute, oxidiert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
 - Va.** Butyryl-CoA, 1 Minute, oxidiert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
 - Vb.** Butyryl-CoA, 1 Minute, oxidiert, 18 K, 20 dB, 2 Scans
 - VI.** CoASH, 10 Minuten, oxidiert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
 - VII.** CoASH + Thiolacton, 10 Minuten, oxidiert, 18 K, 20 dB, 2 Scans. Fehler:
Probenröhrchen enthielt weniger als 200 µl.
 - VIII.** Crotonyl-CoA, 10 Minuten, oxidiert, 18 K, 20 dB, 2 Scans
 - IX.** Crotonyl-CoA + AS, 10 Minuten, oxidiert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
 - X.** Butyryl-CoA, 10 Minuten, oxidiert, 18 K, 20 dB, 2 Scans
 - XI.** CoASH, photoreduziert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
 - XII.** CoASH + Thiolacton, photoreduziert, 10 K, 20 dB, 2 Scans
 - XIII.** Crotonyl-CoA, photoreduziert, 10 K, 20 dB, 2 Scans

Nicht alle Experimente, die für Messungen bei 10 K vorgesehen waren, konnten aufgrund des begrenzten Heliumvorrats durchgeführt werden. So wurden die fehlenden Proben bei 18 K und bei sehr niedrigem Füllstand des Heliumbehälters gemessen.

2.15 ENDOR-Spektroskopie – Effekte der Substratbindung

Eine mögliche Koordination des [4-Fe-4S]-Clusters der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zum Substrat wurde durch die Verwendung von 4-Hydroxy[4-¹³C]butyryl-CoA untersucht. Es soll hier die durch Koordination des Sauerstoffatoms der Hydroxylgruppe mit dem Fe1 des Clusters nachgewiesen werden. Hierbei würde eine Kopplung des ¹³C Atoms des Substrats über 2 Hüllen hinweg zum Signal des Fe-S-Clusters erfolgen.

Alle Proben wurden in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) und mit 20 % Glycerin zur Kryoprotektion eingefroren. Um den Wasserstoffgehalt für die Proben mit D₂O als Lösungsmittel möglichst gering zu halten, wurde das Glycerin zuvor mehrmals mit D₂O versetzt und wieder getrocknet [1 ml D₂O + 1 ml Glycerin, Lyophilisieren, 3 mal wiederholt]. Der Puffer wurde ebenfalls durch Lyophilisieren und Resuspendieren in D₂O überführt.

Die Enzymkonzentration der Proben wurde auf 100 mg / ml (2,8 U / mg) in einem Probenvolumen von 100 µl eingestellt. Das Substrate wurden durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Transferase aus Acetyl-CoA und 4-Hydroxybutyrat bzw. 4-Hydroxy-4-[¹³C]butyrat

hergestellt (siehe Abschnitt 2.8.2). Als Positiv Kontrolle für ein Fe-S-Cluster Signal wurde eine Probe mit Deazaflavin photoreduziert (siehe Abschnitt 2.14). Folgende Proben wurden angefertigt:

- I. Enzym + 4-Hydroxybutyryl-CoA in H₂O
- II. Enzym + 4-Hydroxy[4-¹³C]butyryl-CoA in H₂O
- III. Enzym + 4-Hydroxybutyryl-CoA in D₂O
- IV. Enzym in H₂O
- V. Enzym in D₂O
- VI. Enzym + 4-Hydroxybutyryl-CoA in H₂O, photoreduziert

Alle Arbeiten wurden in einem anaeroben Zelt durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden dort 24 h vor Gebrauch gelagert. Alle Puffer wurden vor Gebrauch anerobisiert (1. Erhitzen 95 °C, 2. Entgasen am Vakuum, 3. Rühren für 24 h im anaeroben Zelt).

Die ENDOR-Messungen erfolgten im Laboratorium von Joshuar Telser (Roosevelt University, Chicago) auf einem Eigenbau.

2.16 NMR-Charakterisierung von Syntheseprodukten

Die NMR-Messungen in dieser Arbeit wurden an Geräten der Firma Bruker BioSpin MRI GmbH (Ettlingen) durchgeführt. Die Standardmessungen zur Charakterisierung der Syntheseprodukte wurden an einem AVANCE 300 B (300 MHz) durchgeführt. Dabei wurden in der Regel ein ¹H-Spektrum bei 300 MHz und ein ¹³C-Spektrum bei 75,45 MHz aufgenommen.

2.17 NMR-Experimente über chirale Verschiebung

Die Messung der chiralen Shift-Experimente wurde an einem Bruker BioSpin DRX400 (400 mHz, Deuteriummessungen) und Bruker BioSpin DRX500 (500 mHz, manuelle Messungen der Shift differenzen) durchgeführt.

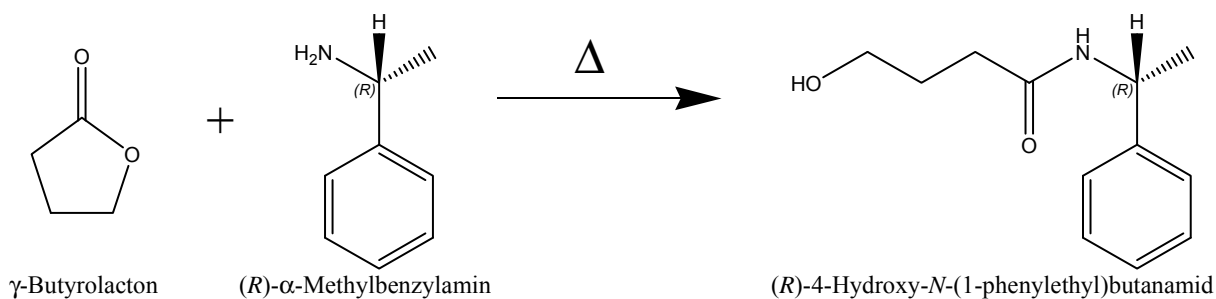
2.17.1 Europium Tris[3-(Heptafluoro-Propylhydroxymethylen)-(+)-Kampfer]-Ligand

Ein chiraler Europium-Kampfer-Ligand (Europium Tris[3-(Heptafluoro-Propylhydroxymethylen)-(+)-Kampfer]) wurde mit γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton in Chloroform gemischt. Der Unterschied in der Verschiebung abhängig von der Stereokonfiguration kann nur relativ zu dem jeweiligen anderen Stereoisomer ermittelt werden. Es wurden also Gemische aus (*R*)- und (*S*)- γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolactonen verwendet mit den reinen Lactonen als Standard für *R*- bzw. *S*-Konfiguration.

Bei zu niedrigen Konzentrationen des Europiumliganden tritt keine oder eine zu schwache Verschiebung der Signale auf. Eine zu hohe Konzentration verbreitert die Signale durch paramagnetische Shift Resonanz und verhindert so eine genaue Auswertung. Zur Bestimmung des optimalen Mischverhältnisses wurden verschiedene Konzentrationen an Europium-Ligand getestet (Lactont zu Eu-Ligand: 1:16, 1:8, 1:4, 1:1). Für die endgültigen Messungen wurde ein äquimolares Verhältnis von Lacton zu Shiftreagenz verwendet.

In einem Ansatz wurden 70 μmol (6 mg, 5,3 μl) eines entsprechenden Lactongemischs (100 % *S*, 66 % *S* + 33 % *R*, 33 % *S* + 66 % *R*, 100 % *R*) mit 83,3 mg Europiumligand für ein äquimolares Verhältnis gemischt. Die NMR-Messungen wurden in CDCl_3 als ^1H Experiment und in CHCl_3 als ^2H -Experiment (nur ^2H -Atome ergeben ein Signal) durchgeführt.

2.17.2 Derivatisierung zu chiralem (*S*)-4-Hydroxy-N-(1-phenylethyl)butyrylamid (10) mit (*R*)- und (*S*)- α -Methylbenzylamin



Zu (*R*)- α -Methylbenzylamine (1ml, 952 mg, 7,86 mmol) wurde γ -Butyrolacton (100 μl , 113 mg, 1,31 mmol) gegeben. Das Gemisch wurde unter Rühren für 16 h bei 80 °C inkubiert. Danach wurde mit HCl (5 M, 2 ml) angesäuert und in Diethylether extrahiert (3 \times 5 ml). Nach Trocknung mit MgSO_4 , Filtration und Eindampfen des Äthers wurde das chirale Amid (6)

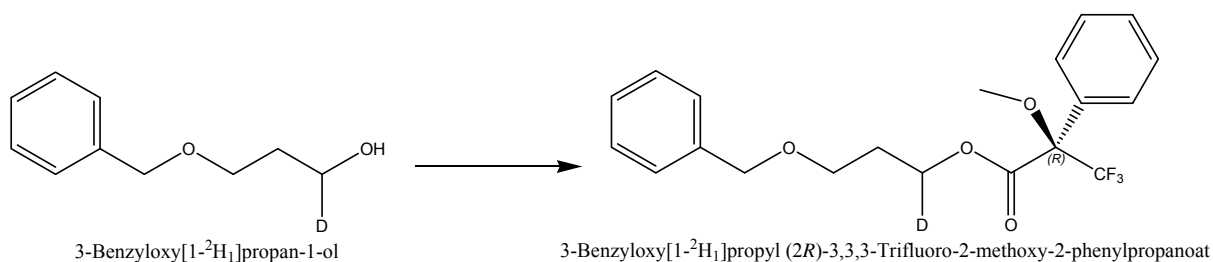
gewonnen (40 mg, 0,19 mmol, 15 % Ausbeute) $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) **300 mHz**: δ 7,95 – 7,25 (5H, m, C_6H_5) δ 5,10 (1H, p, $J = 7,3$, CHN) δ 3,65 (1H, t, $J = 5,95$, CH_2OH) δ 2,24 (2H, m, CH_2ON) δ 1,85 (2H, p, $J = 6,14$, CH_2) δ 1,47 (2H, d, $J = 6,99$, CH_3) **500 mHz**: δ 7,97 – 7,27 (5H, m, C_6H_5) δ 6,19 (1H, d, $J = 5,34$, NH) δ 5,12 (1H, p, $J = 7,27$, CHN) δ 3,67 (1H, t, $J = 5,72$, CH_2OH) δ 2,35 (2H dt, $J = 6,79$ $J = 2,19$, CH_2ON) δ 1,87 (2H, p, $J = 6,00$, CH_2) δ 1,50 (2H, d, $J = 7,02$, CH_3).

Dieselbe Reaktion kann mit (*S*)- α -Methylbenzylamin durchgeführt werden. Beide Reaktionen können mit (*R*)-oder (*S*)- γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton durchgeführt werden, um ein entsprechendes chirales Amid zu erhalten.

2.17.3 Charakterisierung chiraler Alkohole mit Mosher's Acid

Diese Methode zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde erstmals von Mosher et al. entwickelt und später von Speranza et al. zur Analyse von 2-Benzyloxyethanol genutzt (Dale und Mosher 1968; Dale et al. 1969; Dale und Mosher 1973; Sullivan et al. 1973; Speranza et al. 2003). Die Reaktion ist extrem feuchtigkeitsempfindlich, weswegen alle Lösungsmittel destilliert (Pyridin, mit Natrium) oder trocken gekauft (Tetrachlorkohlenstoff) wurden. Die Reaktion wurde in einem flammengetrockneten versiegelten Reaktionsgefäß unter Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt.

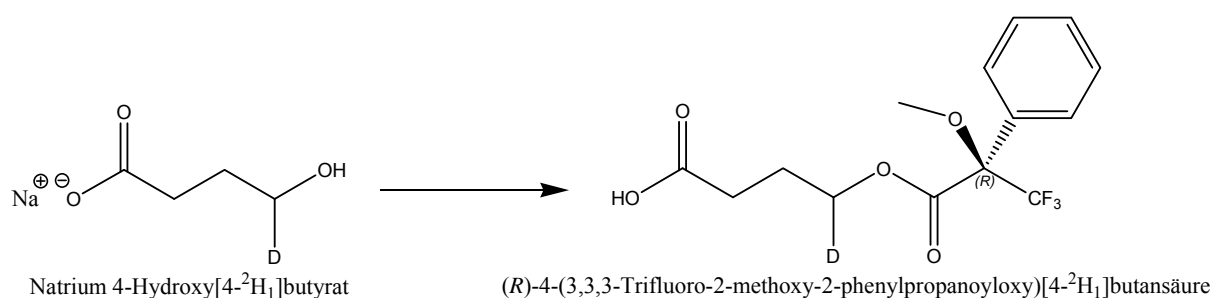
Charakterisierung des Zwischenprodukts 3-Benzyloxy[1- $^2\text{H}_1$]propan-1-ol



Die Reagenzien wurden im Folgenden nacheinander in das Reaktionsgefäß gegeben: Pyridin (300 μl , 300 mg), (*R*)-MTPA (17,5 mg, 13 μl , 0,07 mmol), Tetrachlorkohlenstoff (300 μl) und 3-Benzyloxy[1- $^2\text{H}_1$]propan-1-ol (8,3 mg, 0,05 mmol). Nach anfänglichem Schütteln beginnt sich kristallines Pyridinhydrochlorid abzuscheiden. Die Reaktion ist vollständig abgelaufen (30 Minuten, bei Raumtemperatur), wenn kein weiteres Pyridinhydrochlorid ausfällt. Nun wurde ein Überschuss von 3-Dimethylaminopropyl-1-amin (ca. 0,1 mmol, 10 mg, 12 μl) dazu gemischt und für 5 Minuten abgewartet. Der Reaktionsansatz wurde

danach mit Diethylether (10 ml) verdünnt und mit kalter Salzsäure (1 M), kalter gesättigter Na_2CO_3 – Lösung und kalter gesättigter Natriumchloridlösung gewaschen (jeweils 10 ml bei 4 °C). Nach Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat wurde dieses abfiltriert und das Lösungsmittel verdampft, um 3-Benzoyloxy[1- $^2\text{H}_1$]propyl (2*R*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat (**11**) zu erhalten. Es wurde keine Ausbeute bestimmt, sondern das Produkt direkt für NMR verwendet. ^1H NMR (CDCl_3) δ 4,45 (1H + 2H, m, $\text{CDHO} + \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}$) δ 3,50 (2H + 3H, m, OCH_2CH_2 , CH_3O) δ 1,99 (2H, dt, $J = 7,63, 7,42$, OCH_2CH_2)

Charakterisierung des Endprodukts 4-Hydroxy[4- $^2\text{H}_1$]butyrat



Die Reaktion wurde genauso wie oben beschrieben durchgeführt und 4-Hydroxy[$^2\text{H}_1$]butyrat (Natriumsalz, 6,3 mg, 0,05 mmol) als Ausgangsmaterial verwendet. Es war kein Produkt nachzuweisen.

2.18 Spektroskopie im sichtbaren bis UV-Bereich

Durch die Verwendung verschiedener Substrate sollte eine eventuelle von der veresterten Fettsäure abhängige Zustandsänderung des Flavins in Gegenwart verschiedener CoA-Reste im Vergleich zum natürlichen Substrat Crotonyl-CoA untersucht werden.

Hierfür wurden freies CoASH, Acetyl-CoA und Butyryl-CoA als Beispiele für nicht metabolisierte Substanzen und Crotonyl-CoA als natürliches Substrat verwendet. 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (2,8 U / mg) wurde zunächst in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) mit Kaliumhexacyanoferrat(III) (5 mM im Ansatz) oxidiert (5 Minuten, 17 °C), bevor dieses durch mehrmalige (3 \times auf 5 % Ankonzentrieren und mit 3 ml frischem Puffer auffüllen) Filtration (Centrikon-Konzentratoren, 30 kDa) wieder ausgewaschen wurde. Das so behandelte Enzym wurde mit Puffer auf 500 μl verdünnt (1,6 mg/ml; 4,5 U) und als Blindwert ein Spektrum entlang des Wellenlängenbereichs 300 – 700 nm aufgenommen. Nun

wurden die CoA-Substrate (je 1 mM im Test) zugegeben und in festgesetzten Zeitabständen (0, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40, 50 Minuten, etc.) das Spektrum erneut aufgenommen. Es wurde die Abnahme am Maximum im Bereich von 430 bis 440 nm und die Zunahme an der „charge-transfer“-Bande bei 500-700 nm gegen den Blindwert (ohne Substratgabe) bei den verschiedenen Zeitpunkten beobachtet.

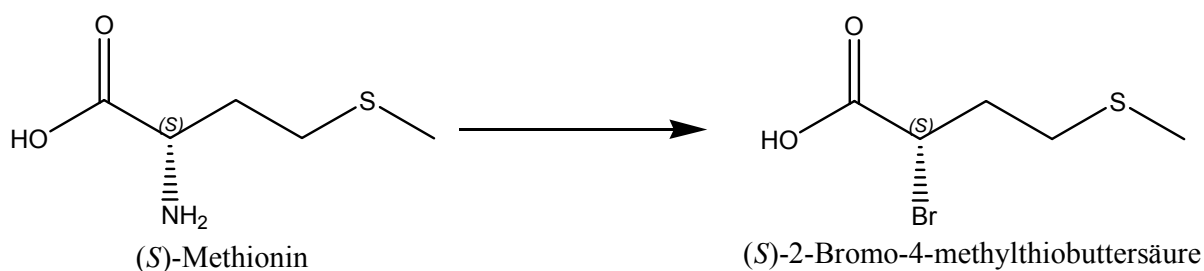
2.19 CD-Spektroskopie der Syntheseprodukte

Die CD-Messungen wurden an einem JASCO J-810 Spectropolarimeter (Jasco Labor und Datentechnik GMBH, Deutschland) durchgeführt. Die Probenkonzentration betrug 4 mg pro ml. Es wurde eine Serie von 20 Messungen pro Probe (Temperatur: 24 °C, Bereich: 196 nm bis 216 nm, Geschwindigkeit: 20 nm pro Minute, Datenaufnahme: 0,2 nm pro Messpunkt, Bandbreite: 1 nm, Schichtdicke: 0,1 cm, Response Time: 2 s) durchgeführt. Der pH-Wert der Proben betrug 2,5. Als Blindwert wurde die Küvette mit Wasser gemessen (5 Messungen).

2.20 Synthese von γ -[$^2\text{H}_1$]Butyrolactonen zur Untersuchung der Stereoselektivität am C2

2.20.1 Synthese über Methionin

(S)-2-Bromo-4-methylthiobuttersäure (S-12)



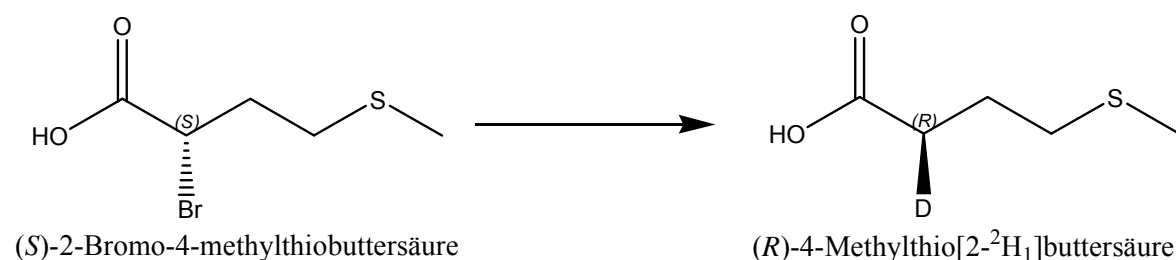
Modifiziert nach (Cooke et al. 2003) wurde zunächst eine Lösung von (S)-Methionin (8,54 g, 57 mmol) in 48 % HBr (53 ml, 976 mmol) und Wasser (80 ml) auf $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt. Nun wurde eine Lösung von Natrium Nitrit (3,95 g, 57,25 mmol) in Wasser (10 ml) tropfenweise unter Rühren zugegeben. Die braune Lösung wurde nun für 2 h bei $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Aufhellung gerührt. Extraktion mit Ethylacetat ($5 \times 50\text{ ml}$), Trocknung mit Magnesiumsulfat, Filtration und Entfernen des Lösungsmittels bei reduziertem Druck ergab

ein orangefarbenes Öl (5,63 g, 26,54 mmol, 47 % Ausbeute). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,12 (3H, s, CH_3), δ 2,33 (2H, m, CH_2), δ 2,66 (2H, m, CH_2S), δ 4,50 (1H, dd, $J = 8,30, 5,86$, CHBr)

(*R*)-2-Bromo-4-methylthiobuttersäure (*R*-12)

(*R*)-Methionin (8,54g, 57 mmol) als Startmaterial führte bei exakter Wiederholung der obigen Synthese zu dem entsprechenden *R*-Isomer einem orangefarbenen Öl (6,36 g, 29,98 mmol, 53% Ausbeute). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,13 (3H, s, CH_3), δ 2,32 (2H, m, CH_2), δ 2,68 (2H, m, CH_2S), δ 4,50 (1H, dd, $J = 8,30, 5,86$, CHBr)

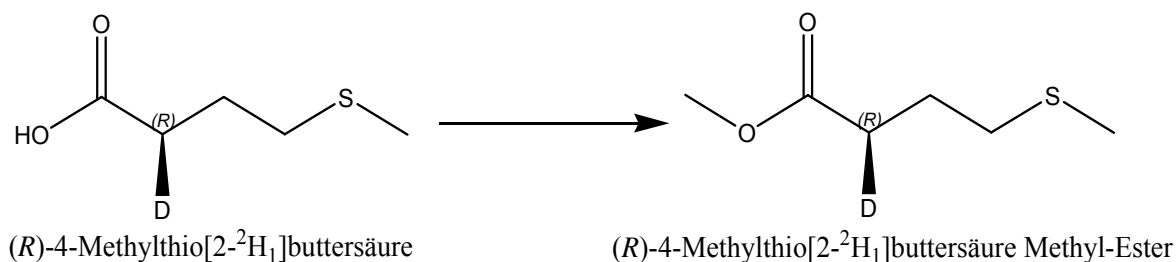
(*R*)-4-Methylthio[2- $^2\text{H}_1$]buttersäure (*R*-13)



Zu einer auf $-5\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlten Lösung von (*S*)-2-Bromo-4-methylthiobuttersäure (*S*-12; 3,125 g, 14,73 mmol) in Tetrahydrofuran (3,125 ml) wurde Triethylbordeuterid (1 M in THF, 50 ml, 50 mmol, 4,4 Äquivalente) tropfenweise zugegeben. Die Lösung wurde 2 h bei $80\text{ }^\circ\text{C}$ erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Essigsäure (5 ml, 85 mmol) abgestoppt. Nach dem Entfernen der Lösemittel bei reduziertem Druck blieb ein weißgelbes Pulver als rohes Produkt zurück (4,61g, Ausbeute im nächsten Schritt). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,93 (2H, dt, $J = 7,16, 7,20$, CH_2), δ 2,10 (3H, s, CH_3) δ 2,49 (1H, tt, $J = 7,36, 2,24$, CDH) δ 2,56 (2H, t, $J = 7,20$, CH_2S)

(*S*)-4-Methylthio[2- $^2\text{H}_1$]buttersäure (*S*-13)

Die gleiche Synthese mit (*R*)-2-Bromo-4-methylthiobuttersäure (*R*-12; 3,125 g, 14,73 mmol) als Startmaterial mit darauf angepassten Mengen an Reagenzien ergab das *R*-Isomer ein weißgelbes Pulver als rohes Produkt (5,25 g; Ausbeute im nächsten Schritt). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,93 (2H, m, CH_2), δ 2,10 (3H, s, CH_3), δ 2,48 (1H, tt, $J = 7,32, 2,28$, CDH) δ 2,56 (2H, t, $J = 7,20$, CH_2S)

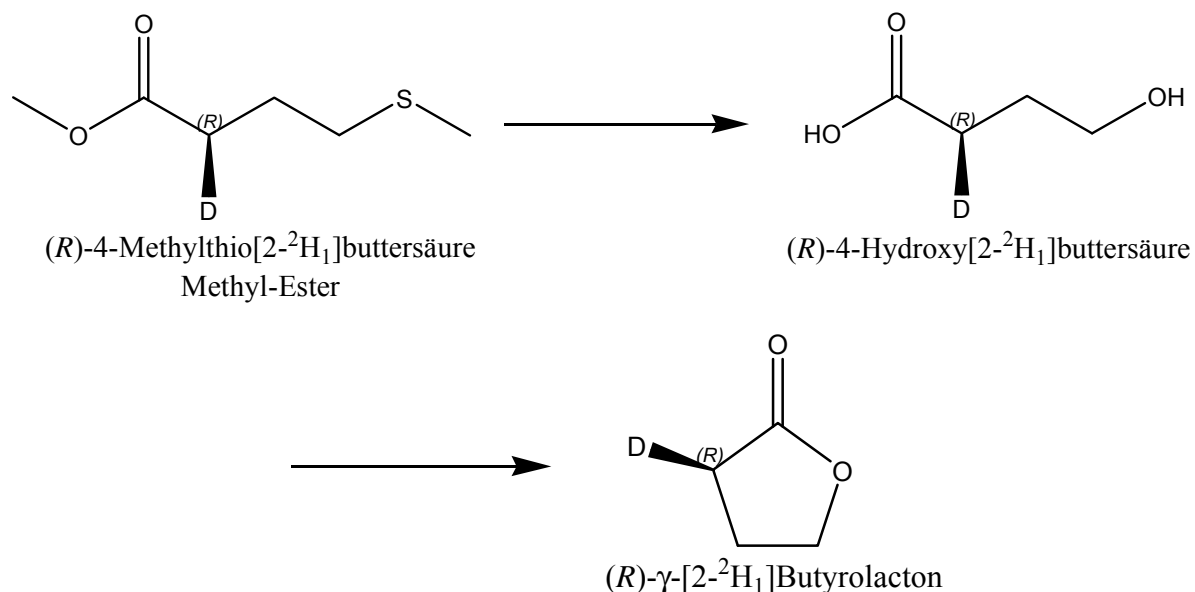
(R)-4-Methylthio[2-²H₁]buttersäuremethylester (R-14)

Der crude Reaktionsansatz ((R)-4-Methylthio[2-²H₁]buttersäure; **R-13**) wurde in Methanol (50 ml) gelöst und konzentrierte Schwefelsäure (2,5 ml, 45 mmol = 90 mmol H⁺) vorsichtig hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 12 h bei Raumtemperatur im Dunklen gerührt. Nach Verdampfen der Lösungsmittel wurde der verbleibende feste Rest in Diethylether resuspendiert und abdekantiert (3 × 20 ml). Die vereinigten Überstände wurden mit Kaliumhydrogenkarbonat gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und ergaben nach Verdampfen der Lösemittel unter reduziertem Druck das Produkt (0,8 g; 7,55 mmol; 51 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,92 (2H, dt, *J* = 7,16, 7,14, CH₂) δ 2,10 (3H, s, SCH₃) δ 2,43 (1H, tt, *J* = 7,32, 2,28, CDH) δ 2,54 (2H, t, *J* = 7,20, CH₂S) δ 3,68 (3H, s, CH₃O) ¹³C NMR δ 15,62 (CH₂) δ 24,38 (SCH₃) δ 32,76 (t, *J* = 19,78, CDH) δ 33,77 (CH₂S) δ 51,93 (CH₃O) δ 173,97 (OCO)

(S)-4-Methylthio[2-²H₁]buttersäuremethylester (S-14)

Die Veresterung mit (S)-4-Methylthio[2-²H₁]buttersäure (**S-13**) führte zum 1,1 g des S-Isomers (10,38 mmol; 70 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,93 (2H, dt, *J* = 7,16, 7,14, CH₂) δ 2,10 (3H, s, SCH₃) δ 2,44 (1H, tt, *J* = 7,32, 2,28, CDH) δ 2,54 (2H, t, *J* = 7,20, CH₂S) δ 3,68 (3H, s, CH₃O) ¹³C NMR δ 15,66 (CH₂) δ 24,41 (SCH₃) δ 32,79 (t, *J* = 19,78, CDH) δ 33,81 (CH₂S) δ 51,97 (CH₃O) δ 174,01 (OCO)

(R)-4-Hydroxy[2-²H₁]buttersäure (R-15); (R)-γ-[2-²H₁]Butyrolacton (R-16)

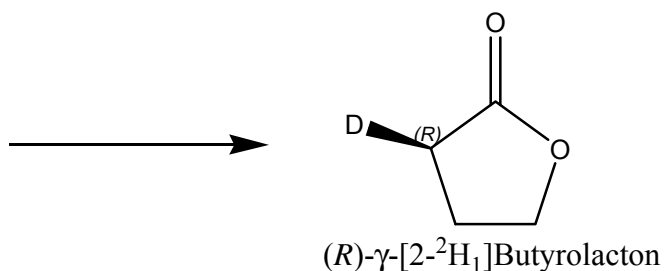


Modifiziert nach (Baldwin et al. 1988) wurde zunächst eine Lösung von (R)-4-Methylthio[2-²H₁]buttersäuremethylester (**R-14**; 800 mg, 7,55 mmol) in Wasser (10 ml) und Acetonitril (2,5 ml) mit Iodomethan (2,13 g, 15,1 mmol, 960 µl) gemischt. Die Reaktion wurde für 12 h im Dunklen bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde Kaliumhydrogenkarbonat (755 mg, 7,55 mmol) hinzugegeben und die Lösung für 2 h auf 80 °C erhitzt. Um (R)-4-Hydroxy[2-²H₁]buttersäure (**R-15**) zu erhalten, wurde zu der abgekühlten Lösung HCl (pH 1 bis 1,5) gegeben und diese wieder für 2 h auf 80 °C erhitzt. Die crude Reaktion wurde nun mit Dichlormethan gemischt und für 12 h gerührt. Das Produkt wurde in Dichlormethan (20 ml) extrahiert und es ergibt sich nach dem Verdampfen des Lösungsmittels ein farbloses Öl (300 mg, 3,45 mmol; 46 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 2,29 (2H, m, CH₂) δ 2,49 (1H, m, CDH) δ 4,36 (2H, t, *J* = 6,88, CH₂O)

(S)-4-Hydroxy[2-²H₁]buttersäure (S-15); (S)-γ-[2-²H₁]Butyrolacton (S-16)

Dieselbe Abfolge von Schritten wurde mit (S)-4-Methylthio[2-²H₁]buttersäuremethylester (**S-14**; 1100 mg, 10,38 mmol) und angepassten Mengen der anderen Reagenzien durchgeführt um 260 mg des S-Isomers zu erhalten (2,99 mmol; 29 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 2,27 (2H, m, CH₂) δ 2,49 (1H, m, CDH) δ 4,36 (2H, t, *J* = 7,08, CH₂O)

Aufreinigung von (*R*)- γ -[2- $^2\text{H}_1$]butyrolacton (*R*-16) über Silicagel Säule

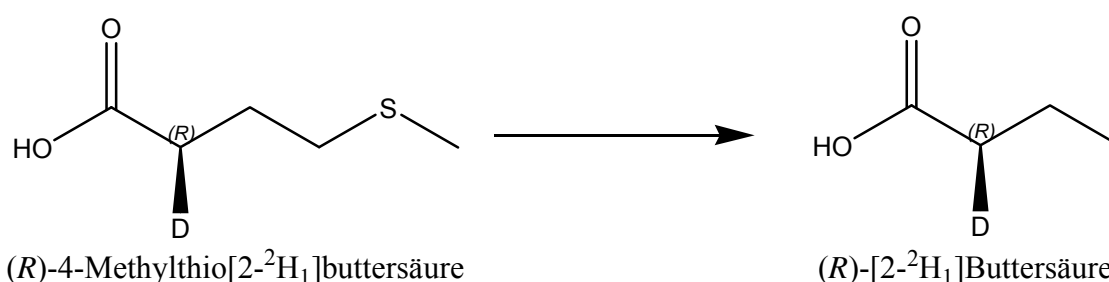


Das Säulenmaterial war Silicagel 60 bei einem Säulenvolumen von 50 ml. Als Laufmittel wurde Diethylether und Petrol 40-60 im Verhältniss 2 zu 1 verwendet. Nach Auftragen des Lactons wurden unter geringem Druck Fraktionen von 8-10 ml gesammelt. Dünnschichtchromatographie wurde benutzt, um die Fraktionen auf Produkt zu testen. Die Fraktionen 12-20 wurden vereinigt und verdampft, um ein farbloses Öl zu gewinnen (160 mg; 1,84 mmol; 53 % Ausbeute). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,26 (2H, dt, $J = 7,93, 7,22$, CH_2) δ 2,49 (1H, m, CDH) δ 4,36 (2H, t, $J = 7,08$, CH_2O) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 22,08 (CH_2) δ 27,49 (t, $J = 20,52$, CDH) δ 68,45 (OCH_2) δ 177,63 (COO)

Aufreinigung von (*S*)- γ -[2- $^2\text{H}_1$]butyrolacton (*S*-16) über Silicagel Säule

Dasselbe Protokoll wie oben wurde für das *S*-Isomer verwendet. Die Ausbeute betrug 100 mg (1,15 mmol, 38 % Ausbeute) ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,27 (2H, m, CH_2) δ 2,49 (1H, m, CDH) δ 4,36 (2H, t, $J = 7,08$, CH_2O) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 22,12 (CH_2) δ 27,52 (t, $J = 20,52$, CDH) δ 68,48 (OCH_2) δ 177,67 (COO)

(*R*)-[2- $^2\text{H}_1$]Buttersäure (*R*-17)



(*R*)-4-Methylthio[2- $^2\text{H}_1$]buttersäure (**R-13**; 1,5 g, 7,07 mmol) wurde in Wasser (150 ml) gelöst und mit Raney Nickel 2800 (15g) gemischt. Die Reaktion wurde für 1 h auf 95 °C

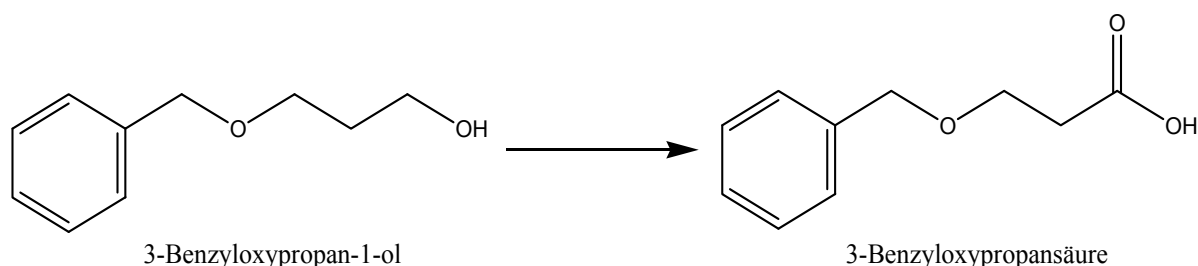
erhitzt und danach bei Raumtemperatur für 12 h inkubiert. Die wässrige Phase wurde abdekantiert und der verbliebene Rest Raney Nickel erneut mit Wasser aufgeschlämmt (3×50 ml). Die gesammelte wässrige Phase wurde filtriert, mit Chloroform gewaschen (4×50 ml) und getrocknet. Das so erhaltene krude Produkt (1,6 g) wurde von verbleibender Bor- und Essigsäure über Dampfdestillation gereinigt. Das Produkt wurde in Wasser (10 ml) gelöst und der pH auf 2 eingestellt. Die Destillation wurde solange fortgesetzt, bis der pH-Wert des Kondensats 6-7 erreichte. Das Kondensat wurde mit NaOH auf pH 8 - 8,5 eingestellt und eingedampft, um das gereinigte Produkt als Natriumsalz zu erhalten (860 mg, 7,74 mmol, quantitativ). ^1H NMR (H_2O) δ 2,12 (1H, tt, $J = 7,04, 1,55$, CDH) δ 1,53 (2H, dt, $J = 14,65, 7,32$, CH_2) δ 0,88 (3H, t, $J = 7.45$, CH_3)

(S)-[2- $^2\text{H}_1$]Buttersäure (S-17)

Wird (S)-4-Methylthio[2- $^2\text{H}_1$]buttersäure (S-13; 1,1 g, 5,18 mmol) als Startmaterial in der obigen Pozedur verwendet und die Mengen der anderen Reragenzien darauf angepasst, so kann das S-Isomer gewonnen werden (1,47 mg, 14,22 mmol, quantitativ). ^1H NMR (H_2O) δ 2,01 (1H, m, CDH) δ 1,42 (2H, dt, $J = 14,57, 7,26$, CH_2) δ 0,76 (3H, t, $J = 7,32$, CH_3)

2.20.2 Synthese über 3-Benzylxypropan-1-ol

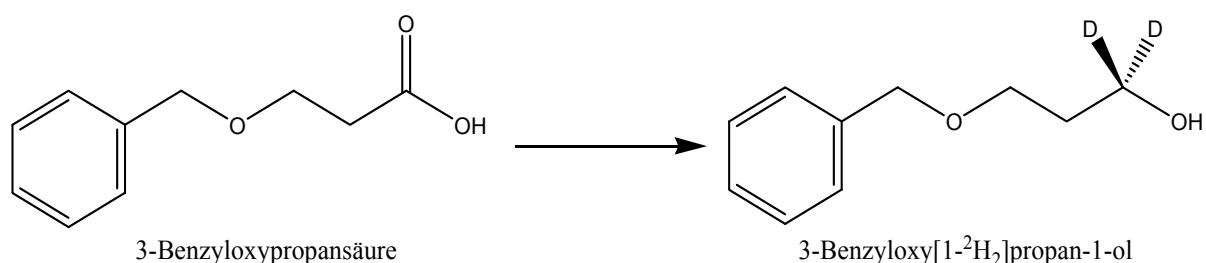
3-Benzylxypropansäure (18)



Herstellung von Jones Reagenz: Crom(VI)oxid (13,4 g, 134 mmol) wurde in konzentrierter Schwefelsäure (11,5 ml) und Wasser (20 ml) aufgelöst. Das Wasser wurde unter ständigem Rühren nach der Säure vorsichtig im Verlauf von 30 Minuten zugegeben. Danach wurde die Lösung mit Wasser auf 50 ml aufgefüllt (Bowers et al. 1953).

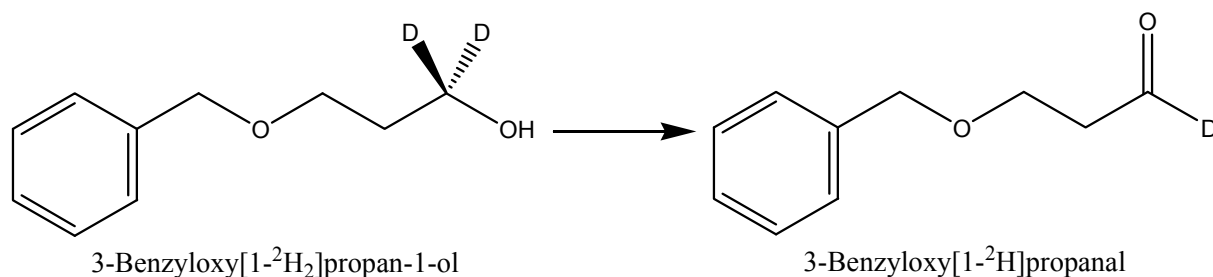
Kommerziell erhältliches 3-Benzoyloxypropan-1-ol (Sigma-Aldrich, 10,0 g, 60,0 mmol) wurde in Aceton gelöst und Jones Reagenz (ca. 37 ml) im Verlauf von 80 Minuten langsam zugegeben, bis eine orange Farbe dauerhaft erhalten blieb. Die Reaktion wurde für weitere 15 Minuten gerührt und dann filtriert. Das orangefarbene Filtrat wurde bei reduziertem Druck eingedampft. Der biphasische Rückstand wurde in Ethylacetat aufgenommen, mit Wasser (2 × 20 ml) und gesättigter Natriumchloridlösung (20 ml) gewaschen, mit Magnesiumsulfat getrocknet und schließlich eingedampft, um ein leicht gelbliches bis farbloses Öl zu erhalten (10,69 g, 59,39 mmol, 94 % Ausbeute). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,67 (2H, t, $J = 6,33$, CH_2) δ 3,76 (2H, t, $J = 6,33$, OCH_2) δ 5,56 (2H, s, CH_2O) δ 7,34 (5H, m, C_6H_5)

3-Benzoyloxy[1- $^2\text{H}_2$]propan-1-ol (19)



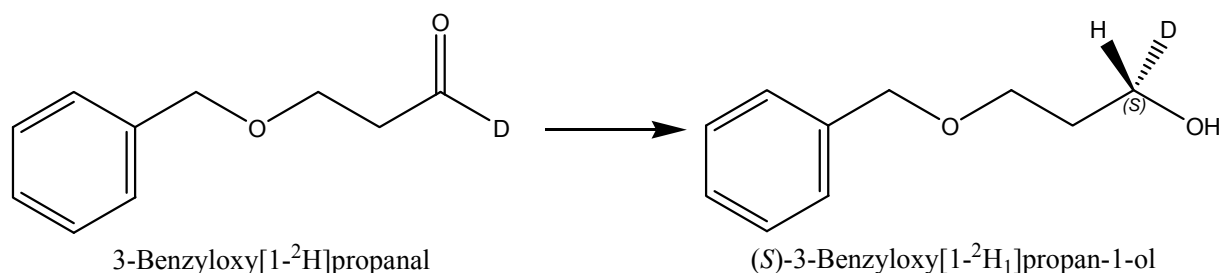
3-Benzoyloxypropionsäure (**18**, 5 g, 27,63 mmol) wurde in Diethylether (100 ml) gelöst und auf 0 °C abgekühlt. Nun wurde tropfenweise LiAlD_4 Lösung (1 M, 27,63 ml, 27,63 mmol) zugegeben. Die Lösung wurde nun 1 h bei 0 °C gerührt und dann für 10 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt. Erneut auf 0 °C abgekühlt wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Natriumchloridlösung (100 ml) abgestoppt. Zur leichteren Aufarbeitung wurde die Reaktion halbiert und jede Hälfte in Diethylether (3 × 60 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden in Portionen von 150 ml mit Wasser gewaschen (2 × 50 ml per Portion). Dann wurde die organische Phase mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel eingedampft, um das Produkt zu erhalten (3,24 g, 22,26 mmol, 81 % yield). ^1H NMR (CDCl_3) δ 1,90 (2H, t, $J = 5,67$, CH_2) δ 3,67 (2H, t, $J = 5,76$, OCH_2) δ 4,53 (2H, s, CH_2O) δ 7,34 (5H, m, C_6H_5)

3-Benzoyloxy[1-²H₁]propanal (20a)

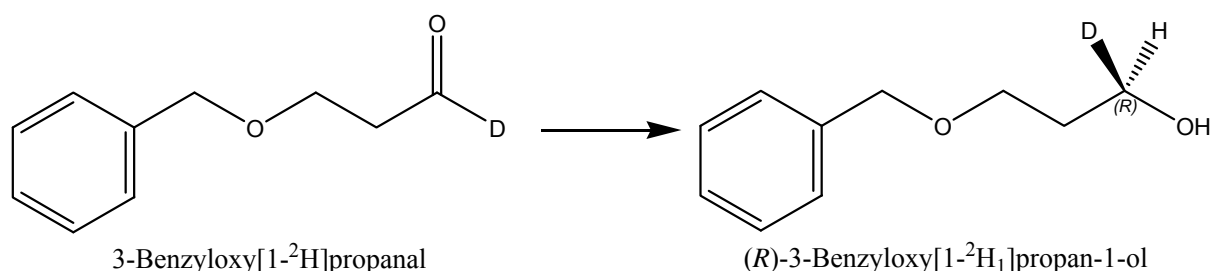


Zu einer Lösung von Oxalylchlorid (1,84 ml, 21,33 mmol) in Dichlormethan (trocken, 60 ml) wurde unter Stickstoff bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ Dimethylsulfoxid (3,03 ml, 42,67 mmol) zugetropft und für 15 Minuten gerührt. Nun wurde über einen Zeitraum von 5 Minuten eine Lösung von 3-Benzoyloxy[1-²H₂]propan-1-ol (**19**) in trockenem Dichlormethan (10,83 mmol, 1,72 ml in 15 ml Dichlormethan) zugegeben. Die Lösung wurde weitere 15 Minuten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gerührt und danach Triethylamin (7,41 ml, 53,61 mmol) tropfenweise zugegeben. Nach 10 Minuten wurde die Kühlung entfernt und die Lösung für 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde Wasser (10 ml) hinzugegeben und für 10 Minuten gerührt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige in Dichlormethan extrahiert ($2 \times 10\text{ ml}$). Die vereinigte organische Phase wurde mit gesättigter Natriumchlorid Lösung gewaschen ($2 \times 10\text{ ml}$), mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft, um das crude Produkt zu erhalten (2,7 g, 16,36 mmol). Der sehr reaktive Aldehyd wurde ohne weitere Reinigung direkt im nächsten Schritt verwendet unter Annahme von 100 % Ausbeute.

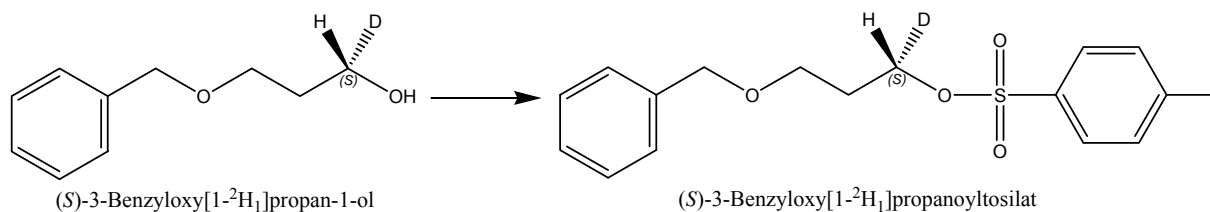
Für eine Charakterisierung dieser Zwischenstufe wurde exemplarisch eine Synthese mit unmarkiertem 3-Benzoyloxypropan-1-ol (10,83 mmol, 1,72 ml) unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Das crude Produkt (**20b**) wurde hierfür über eine Silicagelsäule mit Petrol 40-60 und Diethylether im Verhältnis 1 zu 2 als Laufmittel gereinigt (43 % Ausbeute). Für eine routinemäßige Synthese wurde aufgrund des sehr reaktiven Aldehyds auf diesen Schritt verzichtet. ¹H NMR (CDCl₃) δ 2,71 (2H, dt, $J = 1,76$ $J = 6,09$, CH₂) δ 3,82 (2H, t, $J = 6,14$, OCH₂) δ 4,54 (2H, s, C₆H₅CH₂O) δ 7,34 (5H, m, C₆H₅) δ 9,80 (1H, t, $J = 1,79$, CHO)

(S)-3-Benzyloxy[1-²H₁]propan-1-ol (S-21)

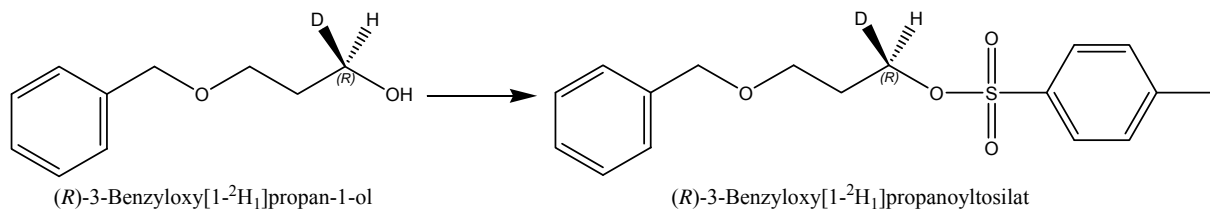
Modifiziert nach (Valentine et al. 1997) wurde zunächst R-ALPINE BORINE™-Lösung (1,1 äquivalent, 23,8 ml, 11,9 mmol) für 15 Minuten bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter Stickstoff gerührt. Nun wurde 3-Benzyloxy[1-²H₁]propanal gelöst in Tetrahydrofuran (10,83 mmol, angenommene 100 % Ausbeute von **20a**, in 10 ml) tropfenweise zugegeben und bei $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2,75 h gerührt. Die leicht gelbliche Lösung wurde auf $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und tropfenweise Ethanolin (1,5 äquivalente, 16,25 mmol, 977 μl) zugegeben. Nach 30 Minuten Rühren bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde mit Wasser (10 ml) abgestoppt. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige in Diethylether extrahiert ($3 \times 20\text{ ml}$). Die vereinigte organische Phase wurde gewaschen (50 ml 1 M H₂SO₄), getrocknet (MgSO₄), filtriert und eingedampft, um krudes Produkt zu erhalten (6,15 g). Über zwei Silicagelsäulen mit Diethylether / Petrol 40-60 als Laufmittel wurde ein farbloses Öl erhalten (1,0 g, 5,99 mmol, 55 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,87 (2H, dt, $J = 5,67, 5,71$, CH₂) δ 3,67 (2H, t, $J = 5,85$, OCH₂) δ 3,78 (1H, m, CDHOH) δ 4,53 (2H, s, C₆H₅CH₂O) δ 7,34 (5H, m, C₆H₅) ¹³C NMR (CDCl₃) δ 32,04 (CH₂) δ 61,60 (t, $J = 21,96$, CDHOH) δ 69,39 (OCH₂) δ 73,30 (C₆H₅CH₂O) δ 127,64, 127,71, 128,45, 138,11 (C₆H₅)

(R)-3-Benzyloxy[1-²H₁]propan-1-ol (R-21)

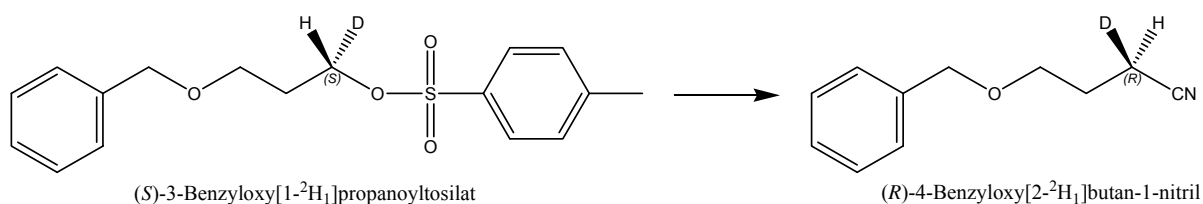
Die Stoffmengen (Startmaterial und Reagenzien) sowie die Reaktionschritte der Synthese von **R-21** entsprachen denen der Synthese von **S-21** nur, dass S-ALPINE BORINE™ zur Reduktion verwendet wurde. Die Ausbeute an krudem Produkt betrug 6,84 g und nach den beiden Silicagel Säulenchromatographieschritten ergab sich ein farbloses Öl (0,98 g, 5,87 mmol, 54 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,87 (2H, dt, $J = 5,60, 5,62$, CH₂) δ 3,67 (2H, t, $J = 5,76$, OCH₂) δ 3,78 (1H, m, CDHOH) δ 4,53 (2H, s, CH₂O) δ 7,34 (5H, m, C₆H₅)

(S)-3-Benzyloxy[1-²H₁]propanoyltosilat (S-22)

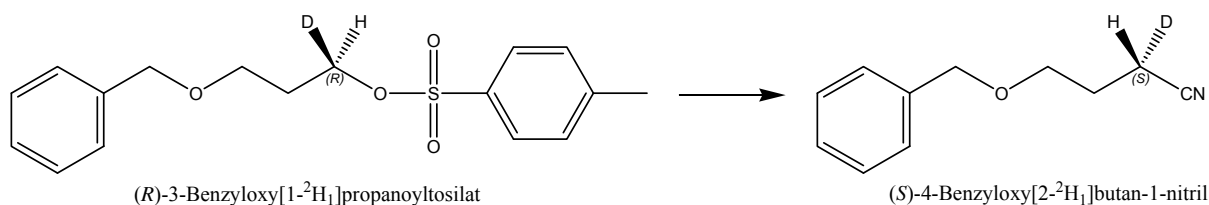
Zu einer Lösung von (S)-3-Benzyloxy[1-²H₁]propan-1-ol (**S-21**, 1 g, 5,99 mmol, 957 µl) in trockenem Pyridin (6 ml) wurde bei 0 °C unter Rühren p-Toluolsulfonylchlorid (3,63 äquivalente, 21,74 mmol, 4,12 g) gegeben. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde die Reaktion in geeistem Wasser (20 ml) abgestoppt und in Diethylether extrahiert (4 × 10 ml). Die organische Phase wurde mit Salzsäure gewaschen (2 × 5 ml, 3 M HCl), mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das eingedampft, um das Produkt zu erhalten (1,61 g, 5,01 mmol, 84 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,94 (2H, dt, *J* = 5,98, 6,00, CH₂) δ 2,43 (3H, s, CH₃) δ 3,50 (2H, t, *J* = 5,95, OCH₂) δ 4,15 (1H, m, CDHOS) δ 4,40 (2H, s, C₆H₅CH₂O) δ 7,59 (9H, m, C₆H₄, C₆H₅)

(R)-3-Benzyloxy[1-²H₁]propanoyltosilat (R-22)

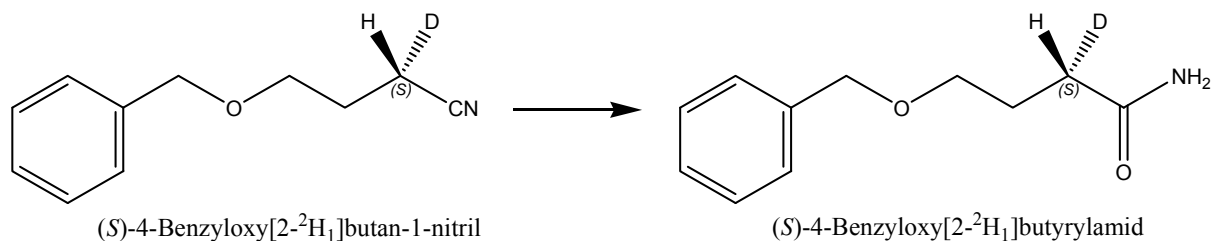
Die Stoffmengen (Startmaterial und Reagenzien) sowie die Reaktionschritte der Synthese von **R-22** entsprachen denen der Synthese von **S-21** nur, dass (R)-3-Benzyloxy[1-²H₁]propan-1-ol (**R-21**, 1 g, 5,99 mmol, 957 µl) als Ausgangsmaterial verwendet wurde. Die Ausbeute betrug 1,34 g Produkt (4,17 mmol, 71 % Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,94 (2H, dt, *J* = 5,98, 5,95, CH₂) δ 2,42 (3H, s, CH₃) δ 3,50 (2H, t, *J* = 5,95, OCH₂) δ 4,16 (1H, m, CDHOS) δ 4,40 (2H, s, CH₂O) δ 7,52 (9H, m, C₆H₄, C₆H₅) ¹³C NMR (CDCl₃) δ 21,60 (CH₂) δ 29,28 (CH₃) δ 65,67 (OCH₂) δ 67,39 (t, *J* = 22,54, CDHOS) δ 73,06 (C₆H₅CH₂O) δ 127,54, 127,64, 127,90, 128,37, 129,81, 129,87, 133,17, 138,09, 144,66 (C₆H₅, C₆H₄)

(R)-4-Benzoyloxy[2-²H₁]butan-1-nitril (*R*-23)

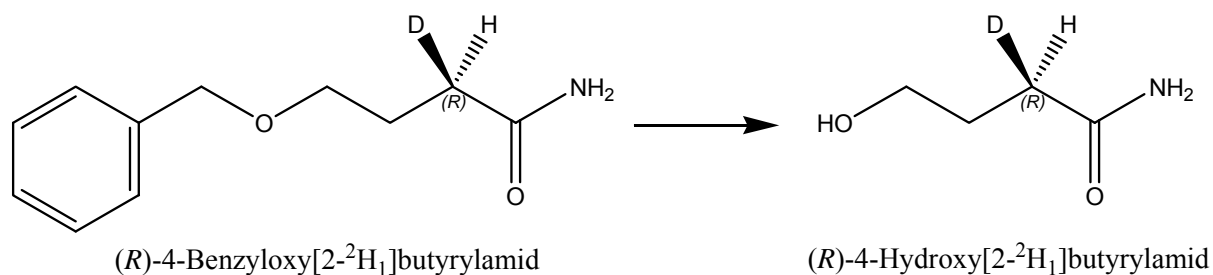
Das Tosylat **S-22** (1,61 g, 5,01 mmol) wurde mit eiskalter gesättigter Natriumzyanidlösung in Dimethylformamid (40 ml) gemischt. Festes Natriumzyanid wurde hinzugegeben und die Mischung für 24 h gerührt. Die Lösung wurde nun mit geeistem Wasser verdünnt und in Diethylether extrahiert (5 × 30ml). Die organische Phase wurde mit Wasser gewaschen (2 × 25 ml), mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und eingedampft, um das Produkt zu erhalten (0,9 g, 5,11 mmol, quantitative Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,94 (2H, dt, *J* = 6,36, 6,09, CH₂) δ 2,49 (1H, m, CDHCN) δ 3,59 (2H, t, *J* = 5,76, OCH₂) δ 4,52 (2H, s, CH₂O) δ 7,33 (5H, m, C₆H₅) ¹³C NMR (CDCl₃) δ 25,41 (CH₂) δ 32,43 (t, *J* = 19,36, CDH) δ 69,34 (OCH₂) δ 73,01 (C₆H₅CH₂O) δ 127,72, 128,45, 138,31 (C₆H₅) δ 175,07 (CN)

(S)-4-Benzoyloxy[2-²H₁]butan-1-nitril (*S*-23)

Die Stoffmengen (Startmaterial und Reagenzien) sowie die Reaktionsschritte der Synthese von **S-23** entsprechen denen der Synthese von **R-23** nur, dass das Tosylat **R-22** (1,61 g, 5,01 mmol) als Ausgangsmaterial genutzt wurde. Die Ausbeute betrug 0,81 g Nitril **S-19** (4,6 mmol, quantitative Ausbeute). ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,94 (2H, dt, *J* = 6,23, 6,00, CH₂) δ 2,49 (1H, m, CDHCN) δ 3,59 (2H, t, *J* = 5,76, OCH₂) δ 4,52 (2H, s, CH₂O) δ 7,33 (5H, m, C₆H₅) ¹³C NMR (CDCl₃) δ 25,80 (CH₂) δ 32,74 (t, *J* = 19,35, CDH) δ 67,60 (OCH₂) δ 73,25 (C₆H₅CH₂O) δ 127,70, 127,83, 128,49, 137,93 (C₆H₅) δ 174.9627 (CN)

(S)-4-Benzyloxy[2-²H₁]butyrylamid (*S*-24)

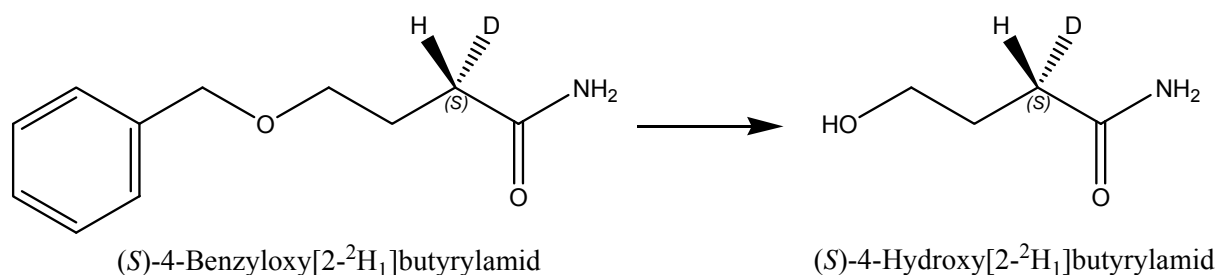
Die Stoffmengen (Startmaterial und Reagenzien) sowie die Reaktionsschritte der Synthese von **S-24** entsprechen denen der Synthese von **R-24** nur, dass das Nitril **S-23** (900 mg, 818 µl, 5,11 mmol) als Ausgangsmaterial genutzt wurde, um das vorläufige semi-kristalline Produkt zu erhalten (0,9 g, 4,62 mmol, 100 % Ausbeute). Die erste Rekristallisation ergab weiße Kristalle als Produkt (370 mg, 1,897 mmol, 41 % Ausbeute) und ein erneuter Umsatz der Mutterlauge (450 mg, 2,56 mmol, 56 % unreagiert) mit entsprechend angepassten Mengen an Reagenzien führte zu einem vorläufigen gelben semi-kristallinen Produkt (0,42 g, 2,15 mmol, 84 % Ausbeute), welches durch Rekristallisation gereinigt weiße Kristalle ergab (130 mg, 0,67 mmol, 26 % Ausbeute). Die vereinigten Kristallfraktionen (510 mg, 2,62 mmol, 57 % Gesamtausbeute) wurden im nächsten Schritt verwendet. ¹H NMR (CDCl₃) δ 1,94 (2H, dt, *J* = 6,29, 6,33, CH₂) δ 2,34 (1H, m, CDHCNH₂) δ 3,54 (2H, t, *J* = 5,95, OCH₂) δ 4,50 (2H, s, CH₂O) δ 5,60 (2H, d, *J* = 37,58, NH₂) δ 7,33 (5H, m, C₆H₅) ¹³C NMR (CDCl₃) δ 25,39 (CH₂) δ 32,42 (t, *J* = 19,94, CDH) δ 69,32 (OCH₂) δ 72,98 (C₆H₅CH₂O) δ 127,68, 127,70, 128,43, 138,29 (C₆H₅) δ 175,21 (CONH₂)

(R)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyrylamid (*R*-25)

Rekristallisiertes (*R*)-4-Benzyloxy[2-²H₁]butyrylamid (**R-24**, 500 mg, 2,56 mmol) wurde in Methanol (7,5 ml) gelöst. Nach der Zugabe von einem Paladiumkatalysator (10 % Pd per Kohlenstoff, 621 mg) wurde die Gasphase viermal mit Wasserstoff ausgetauscht und 16 h unter Wasserstoffatmosphäre bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde die Reaktion durch

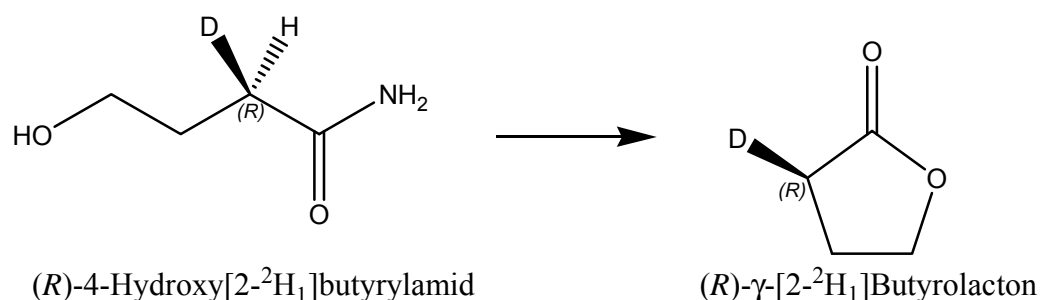
Silicagel gefiltert und das Lösungsmittel eingedampft, um ein farbloses Öl zu erhalten (0,26 g, 2,5 mmol, 98 % Ausbeute). Es wurde kein NMR-Spektrum angefertigt, da direkt die nächste Synthesestufe angeschlossen wurde. Für eine NMR-Referenz siehe die Synthese von (*S*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyrylamid (**S-25**).

(*S*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyrylamid (S-25**)**



Die Reaktionschritte der Synthese von **S-25** entsprechen denen der Synthese von **R-25** nur, dass rekristallisiertes (*S*)-4-Benzyloxy[2-²H₁]butyrylamid (**S-24**, 510 mg, 2,62 mmol) als Ausgangsmaterial genutzt wurde und die Reagenzien entsprechend der Stoffmenge von **S-24** angepasst wurden, um ein farbloses Öl zu erhalten (0,25 g, 2,4 mmol, 92 % yield). ¹H NMR (D₂O) δ 1,70 (2H, dt, *J* = 6,74, 6,75, CH₂) δ 2,21 (1H, m, CDHCONH₂) δ 3,49 (2H, t, *J* = 6,52, HOCH₂) ¹³C NMR (D₂O) δ 27,58 (CH₂) δ 31,33 (t, *J* = 19,94, CDH) δ 60,85 (HOCH₂) δ 179,53 (CONH₂)

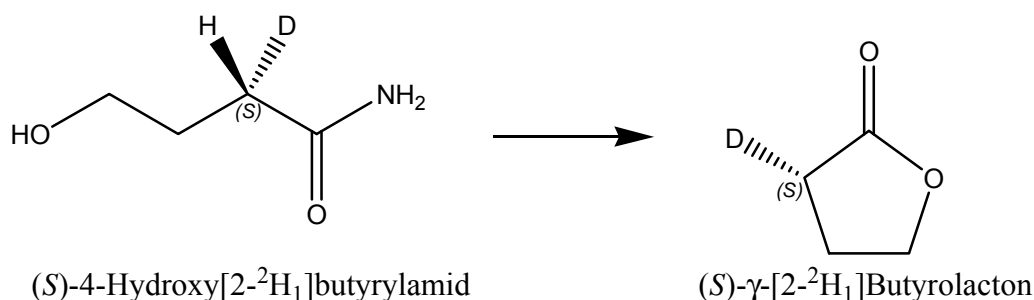
(*R*)-γ-[2-²H₁]Butyrolacton (R-16**)**



(*R*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyrylamid (**R-25**, 0,26 g, 2,5 mmol) wurde in Salzsäure (1 M, 6 ml, 6 mmol) gelöst und kräftig mit Dichlormethan (15 ml) für 24 h verrührt. Das Dichlormethan wurde abgenommen und die wässrige Phase erneut mit Dichlormethan für 30 Minuten verrührt. Dies wurde noch einmal wiederholt. Die vereinigte organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert; das Lösungsmittel wurde entfernt, um das Produkt

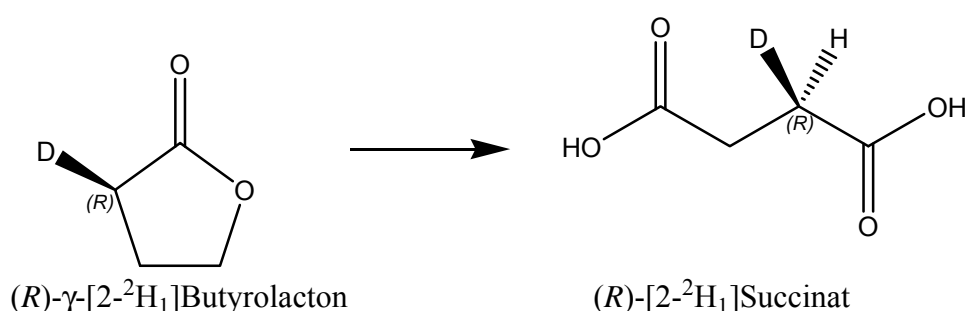
zu erhalten (250 mg, 2,87 mmol, quantitative Ausbeute). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,26 (2H, dt, J = 7,99, 7,27, CH_2) δ 2,49 (1H, m, CDHCO_2) δ 4,36 (2H, t, J = 6,99, OCH_2) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 22,08 (CH_2) δ 27,48 (t, J = 20,52, CDH) δ 68,44 (CH_2CO) δ 177,62 (COO)

(*S*)- γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (*S*-16)



Die Reaktionschritte der Synthese von *S*-16 entsprechen denen der Synthese von *R*-16 nur, dass (*S*)-4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_1$]butyrylamid (*S*-25, 0,25 g, 2,4 mmol) als Ausgangsmaterial genutzt wurde, um das Produkt zu erhalten (250 mg, 2,87 mmol, quantitative Ausbeute). ^1H NMR (CDCl_3) δ 2,27 (2H, dt, J = 7,93, 6,89, CH_2) δ 2,49 (1H, m, CDHCO_2) δ 4,36 (2H, t, J = 6,99, OCH_2) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 22,07 (CH_2) δ 27,48 (t, J = 20,52, CDH) δ 68,44 (OCH_2) δ 177,63 (COO)

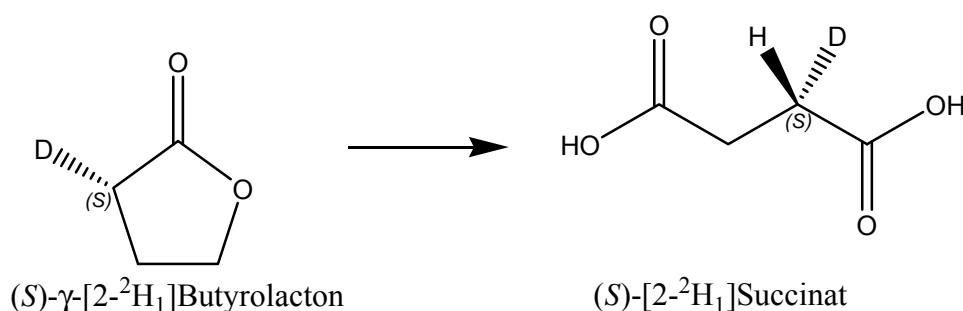
(*R*)-[2- $^2\text{H}_1$]Succinat (*R*-26) ausgehend von 3-Benzylloxypropan-1-ol



(*R*)- γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (*R*-16, 22,6 mg, 0,26 mmol) wurde in Natriumhydroxid (0,1 ml, 5 M) aufgelöst und für 5 Minuten gerührt. Nach Zugabe von Natriumphosphat Puffer (1 ml, 0,67 M) wurde der pH mit Salzsäure (5 M) auf 6,8 eingestellt. Danach wurden TEMPO (3,3 mg, 0,182 mmol) und Acetonitril (1,33 ml) hinzugefügt und das Gemisch auf 35 °C erhitzt. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 2,5 h NaOCl-Lösung (10-13 % verfügbares Chlor; 0,33 ml in 1,83 ml H_2O , 0,239 mM) und NaClO_2 (60 mg, 0,53 mmol in 260 μl H_2O)

tropfenweise zugegeben (Achtung: Bleiche (NaOCl) und NaClO₂ vor Zugabe zum Reaktionsgemisch nicht mischen!). Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der pH auf 8,5 eingestellt (5 M NaOH, 70 – 100 µl). Bei 0 °C wurde die Reaktion dann mit Na₂SO₃ (1.33 ml, 0.24 g in 4 ml) abgestoppt und noch 0,5 h bei Raumtemperatur gerührt (pH 8,5 – 9). Nach Ansäuern (pH 1) wurde die Reaktion in tert-Butylmethylether extrahiert (3 × 5 ml), mit Magnesiumsulfat getrocknet und filtriert. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde ein weißer kristalliner Feststoff erhalten (16 mg, 0,13 mmol, 52 % yield). ¹H NMR (D₂O) δ 2,53 (2H, s, CH₂) δ 2,54 (1H, m, CDH) ¹³C NMR (D₂O) δ 28,50 (t, *J* = 19,65, CDH) δ 28,70 (CH₂) δ 177,01 (COO).

(S)-[2-²H₁]Succinat (*S*-26) ausgehend von 3-Benzylloxypentan-1-ol



Die Stoffmengen (Startmaterial und Reagenzien) sowie die Reaktionschritte der Synthese von **S-26** entsprechen denen der Synthese von **R-26** nur, dass (S)-γ-[2-²H₁]Butyrolacton (**S-16**) (22,6 mg, 0,26 mmol) als Ausgangsmaterial genutzt wurde, um einen weißen kristallinen Feststoff zu erhalten (18 mg, 0,15 mmol, 58 % Ausbeute). ¹H NMR (D₂O) δ 2,51 (2H, s, CH₂) δ 2,52 (1H, m, CDH) ¹³C NMR (D₂O) δ 28,50 (t, *J* = 19,94, CDH) δ 28,70 (CH₂) δ 177,01 (COO).

(R)-[2-²H₁]Succinat (*R*-26) und (S)-[2-²H₁]Succinat (*R*-26) ausgehend von Methionin

Die Stoffmengen (Startmaterial und Reagenzien) sowie die Reaktionschritte der Synthese von **R-26** bzw. **S-26** mit den Lactonen aus der Methioninsynthese entsprechen denen der Synthese von **R-26** bzw. **S-26** nur, dass (*R*)- bzw. (S)-γ-[2-²H₁]Butyrolacton (**R-16**, **S-16**, 22,6 mg, 0,26 mmol), das aus Methionin hergestellt worden war, als Ausgangsmaterial genutzt wurde. Als Produkt wurde auch hier jeweils ein weißer kristalliner Feststoff erhalten.

R-26: 23 mg, 0,19 mmol, 73 % Ausbeute. ^1H NMR (D_2O) δ 2,52 (2H, s, CH_2) δ 2,53 (1H, m, CDH) ^{13}C NMR (D_2O) δ 28,48 (t, $J = 19,81$, CDH) δ 28,69 (CH_2) δ 176,98 (COO).

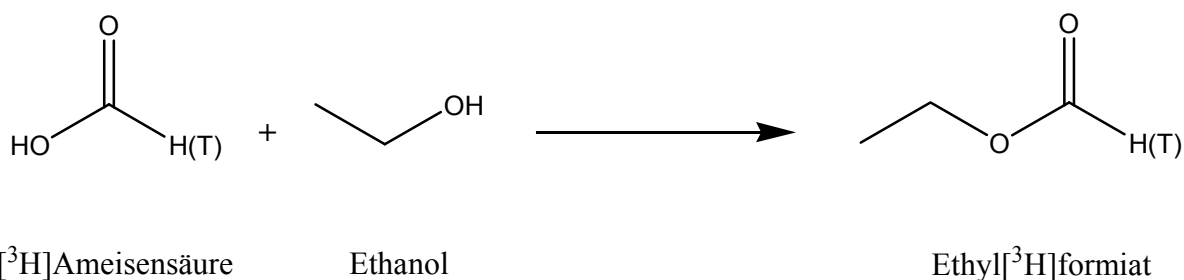
S-26: 14 mg, 0,11 mmol, 42 % Ausbeute. ^1H NMR (D_2O) δ 2,50 (2H, s, CH_2) δ 2,51 (1H, m, CDH) ^{13}C NMR (D_2O) δ 28,49 (t, $J = 19,90$, CDH) δ 28,69 (CH_2) δ 177,00 (COO).

2.21 Experimente zur chiralen Methylgruppe

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte über Flüssigszintillationsmessungen an einem LS 6500 Multi-Purpose-Scintillation-Counter der Firma Beckman Coulter GmbH (Krefeld).

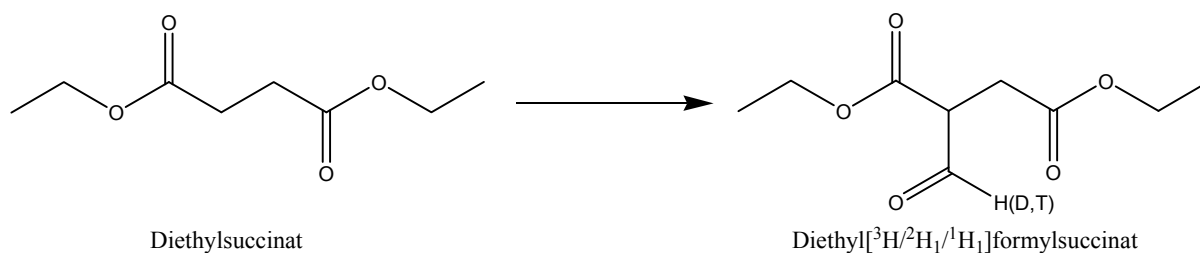
2.21.1 Organische Synthesen

Ethyl[^3H]formiat (27)



Eine Lösung von unmarkiertem Natriumformiat (1,7g, 25 mmol) und Natrium[^3H]formiat (500 μCi , 2 Ci/mmol) in Ethanol (75 ml) wurde mit konzentrierter Schwefelsäure (2 ml) gemischt und für 2 Tage gerührt. Das Gemisch wurde bei atmosphärischem Druck destilliert. Der Sammelbehälter wurde auf $-80\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt (flüchtige Radioaktivität). Das Produkt destillierte bei $52\text{ }^\circ\text{C}$. Es wurde jedoch zur Vermeidung von Radioaktivitätsverlust weiter Kondensat gesammelt bis die Temperatur auf $75\text{ }^\circ\text{C}$ anstieg. Daher enthält das Produkt einen Anteil an Ethanol (5,4 g, 58,7 μCi , 12 % Ausbeute). Eine Charakterisierung mit NMR-Spektroskopie wurde wegen der Tritiummarkierung nicht durchgeführt.

Diethylformylsuccinat (28a-c)

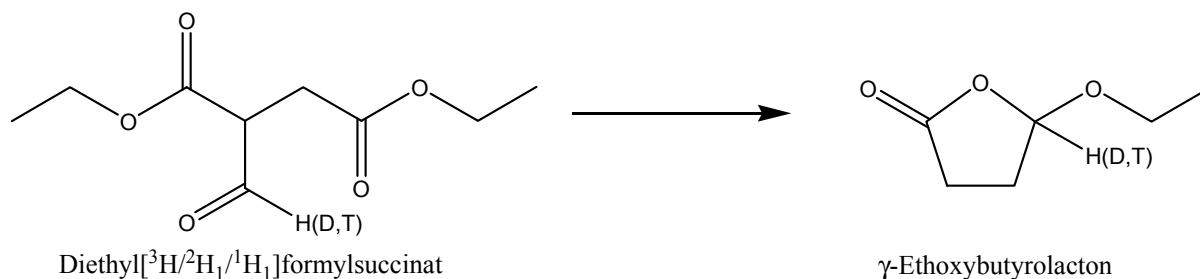


Eine Lösung von Natriumethanolat (2,28 g, 33,5 mmol) in trockenem Toluol (6 ml) wurde auf 0 °C abgekühlt. Nun wurde in kleinen Portionen unter Rühren eine Mischung aus Diethylsuccinat (4,73 g, 27,5 mmol) und Methyl[²H]formiat (2,05 g, 33,5 mmol) zugegeben. Die Mischung wurde für 72 h bei Raumtemperatur gerührt. Nun wurde zerstoßenes Eis hinzugegeben, gefolgt von genügend H₂SO₄, um ein Ansäuern (pH 1) zu gewährleisten. Die wässrige Phase wurde entfernt und mit Diethylether extrahiert (2 × 30 ml). Die vereinigte organische Phase wurde mit Kaliumhydrogenkarbonatlösung (1 M, 2 × 25 ml) zur Neutralität gewaschen, gefolgt von Wasser (2 × 25 ml). Trocknen mit Magnesiumsulfat, Filtrieren und anschließendes Eindampfen des Lösungsmittels ergab ein krudes gelbes Öl (7,77 g, 38,28 mmol, 139 % Ausbeute). Reinigung des kruden Produkts über eine Silicagel-Säule (Säulenvolumen 150 ml, Fraktionsgröße 10 ml, Pool 13 - 50) mit Petrol 40-60 / Ethylacetat (3:2) als Laufmittel ($R_f = 0,71$) ergab ein farbloses Öl (4,58 g, 22,56 mmol, 82,8 % Ausbeute an **28a**). NMR zeigt Keto- Enol-Tautomerie Verhältnis 3:2. Keto: ¹H NMR (CDCl₃) δ 4,33 – 4,07 (4H, m, 2 × CH₂CH₃) δ 3,70 (1H, m, CHCDO) δ 2,92 + 2,90 (2H, d, $J = 6,04 - 6,23$, CH₂) δ 1,26 (6H, m, 2 × CH₂CH₃) Enol: δ 11,52 (1H, m, CHCOD) δ 7,17 (1H, m, CHCOD) δ 4,33 – 4,07 (4H, m, 2 × CH₂CH₃) δ 3,05 (2H, s, CH₂) δ 1,26 (6H, m, 2 × CH₂CH₃)

Für unmarkiertes Material (**28b**) wurde die Synthese mit Methylformiat durchgeführt. Ausbeute: 4,17g (20,64 mmol, 75,1 %). NMR zeigt Keto- Enol-Tautomerie im Verhältnis 3:2. Keto ¹H NMR (CDCl₃) δ 9,92 (1H, s, CHO) δ 4,33 – 4,08 (4H, m, 2 × CH₂CH₃) δ 3,79 (1H, t, $J = 6,14$ CHCHO) δ 2,92 + 2,90 (2H, d, $J = 6,04 - 6,23$, CH₂) δ 1,28 (6H, m, 2 × CH₂CH₃) Enol: ¹H NMR (CDCl₃) δ 11,53 (1H, d, $J = 12,65$, CHCOH) δ 7,09 (1H, d, $J = 12,65$, CHCOH) δ 4,33 – 4,08 (4H, m, 2 × CH₂CH₃) δ 3,05 (2H, s, CH₂) δ 1,28 (6H, m, 2 × CH₂CH₃) ¹³C NMR (CDCl₃) δ 195,74 (CHO) δ 167,97 (CHCOOCH₂CH₃) δ 162,63 (CH₂COOCH₂CH₃) δ 61,10 (CH) δ 54,03 (CH₂) δ 33,01 (CHCOOCH₂CH₃) δ 29,95 (CH₂COOCH₂CH₃) δ 14,14 (CHCOOCH₂CH₃) δ 14,08 (CH₂COOCH₂CH₃)

Diethyl[^3H]formylsuccinat (**28c**) wurde wie oben beschrieben aus Ethyl[^3H]formiat (**27**) hergestellt. Ausbeute: 3,92 g (19,4 mmol, 97 %) (spezifische Aktivität 1913,8 cpm/ μmol , 0,9 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$; 1,5 % Ausbeute). Eine Charakterisierung mit NMR-Spektroskopie wurde aufgrund der Tritiummarkierung nicht durchgeführt.

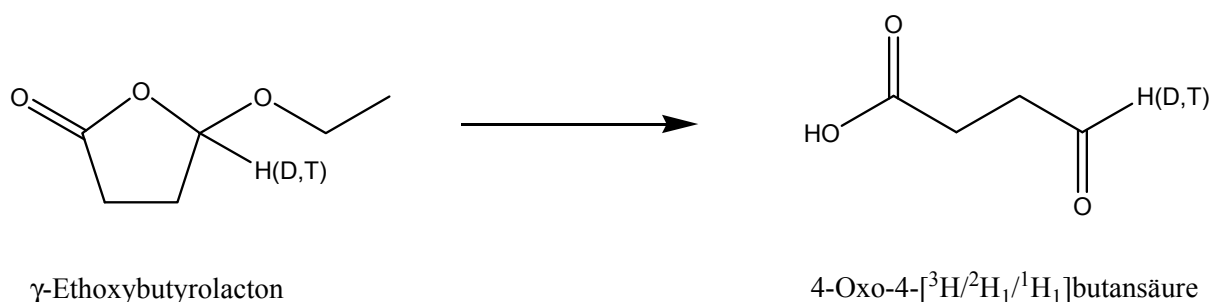
γ -Ethoxybutyrolacton (**29a-c**)



Diethyl[$^2\text{H}_1$]formylsuccinat (4,58 g, 22,56 mmol, **28a**), Ethyl-Orthoformiat (4,6 g, 31,04 mmol), p-Toluolsulfonsäure (55 mg, 0,51 mmol) und Ethanol (3 ml) wurden in einen Rundkolben (50 ml) gegeben. Das Gemisch wurde 2 h bei 60 °C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde eine Lösung von Kaliumhydroxid in Ethanol (3,83 g, 72 mmol, 25 ml) hinzugefügt und das Gemisch für 2 h auf 80 °C unter Rückfluss erhitzt. Der Ethanol wurde unter reduziertem Druck verdampft und das erhaltene Kaliumsalz in Deuteriumoxid (10 ml) gelöst. Um neutrale Nebenprodukte zu eliminieren, wurde die wässrige Phase mit Diethylether gewaschen (2×10 ml). Nach Ansäuern (pH 1) mit konzentrierter Schwefelsäure (für minimalen Wassergehalt; vorsichtig zugeben!) wurde in Diethylether extrahiert (3×20 ml). Die organische Phase wurde mit Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und dann das Lösungsmittel verdampft, um ein krudes Öl zu erhalten (2,8 g, 21,5 mmol, 95,4 % Ausbeute). Das Öl wurde in einem Rundkolben (25 ml) mit einer kurzen Vigreux Säule unter reduziertem Druck (Wasserstrahlpumpe) destilliert. Beim Erhitzen erfolgt zunächst ab 95 °C eine Decarboxylierung und ein Abdampfen des Ethanols. Danach wurden zwei Fraktionen gesammelt: 1. bei 120 – 130 °C ein leicht gelbliches Öl (0,26 g, 1,98 mmol, 8,8 % Ausbeute), 2. die Überreste am Boden der Kolonne (nicht in der Reservoirflasche) nach dem Abkühlen als farbloses Öl (0,23g, 1,76 mmol, 7,7 % Ausbeute an **29a**). Beide Fraktionen enthielten das Produkt. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,87 + 3,61 (2H, m, CH_2 , CH_3) δ 2,67 (1H, m, H-3) δ 2,41 (2H, m, H-3 und H-4) δ 2,14 (1H, m, H-4) δ 1,24 (3H, t, $J = 6,99$, CH_2CH_3) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 176,70 (CO) δ 103,97 (t, $J = 26$ C-4) δ 65,10 (d, $J = 4,05$, CH_2CH_3) δ 28,75 (d, $J = 10,40$, C-3) δ 26,80 (t, $J = 6,36$, C-2) δ 14,90 (CH_2CH_3)

Für unmarkiertes Material (**29b**) wurde die Synthese mit unmarkiertem Diethylformylsuccinat (**28b**) durchgeführt. Ausbeute: 240 mg (1,83 mmol, 8,9 %) ^1H NMR (CDCl_3) δ 5,47 δ 3,80 + 3,54 (2H, m, CH_2 , CH_3) δ 2,59 (1H, m, H-3) δ 2,37 (2H, m, H-3 und H-4) δ 2,07 (1H, m, H-4) δ 1,17 (3H, t, $J = 7,18$, CH_2CH_3) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 175,58 (CO) δ 103,07 (C-4) δ 64,20 (CH_2CH_3) δ 27,82 (C-3) δ 25,83 (t, $J = 6,36$, C-2) δ 13,91 (CH_2CH_3). Zur Tritiummarkierung von γ -Ethoxy[4- ^3H]butyrolacton (**29c**) wurde Diethyl[^3H]formylsuccinat (**28c**) in der oben beschriebenen Synthese verwendet. Ausbeute: 108 mg (831 μmol , spezifische Aktivität 2719 cpm/ μmol , 1,2 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, quantitative Ausbeute an **29c**). NMR wurde Aufgrund der Tritiummarkierung nicht durchgeführt.

4-Oxo-[4- $^2\text{H}_1$]butansäure (30a)



γ -Ethoxy[4- $^2\text{H}_1$]butyrolacton (**29a**; 1,33 μl , 10 μmol) wurde über 40 Minuten in Wasser (100 μl) zu 4-Oxo-[4- ^2H]butansäure und Ethanol gespalten. Der Ethanolgehalt wurde verringert, indem zweimal nach Volumenreduktion auf 60 % unter reduziertem Druck mit Wasser wieder aufgefüllt wurde. Die wässrige Lösung wurde direkt für den nächsten Schritt weiterverwendet. ^1H NMR (D_2O) δ 3,49 (2H, q, $J = 7,11$, HOCH_2CH_3) δ 2,30 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) δ 1,73 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) δ 1,02 (3H, t, $J = 7,08$, HOCH_2CH_3)

4-Oxobutansäure (30b)

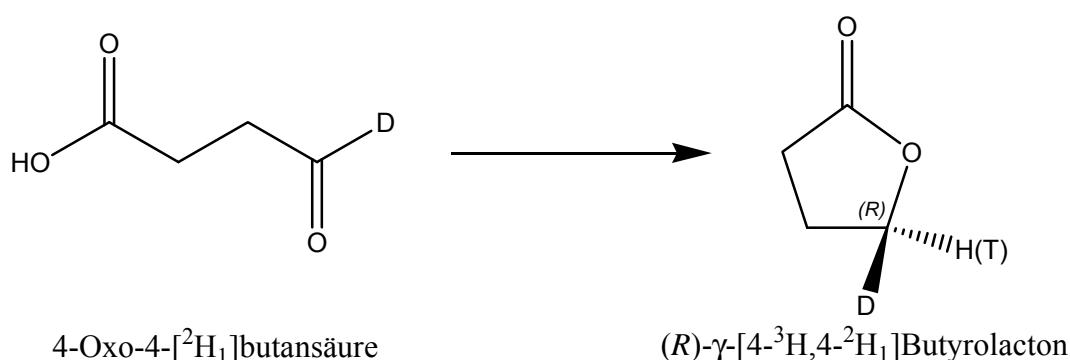
Unmarkierte 4-Oxobutansäure (**30b**) wurde nach der oben beschriebenen Vorschrift mit unmarkiertem γ -Ethoxybutyrolacton (**29b**) hergestellt. ^1H NMR (D_2O) δ 4,89 (1H, m, CHO als Hydrat $\text{CH}(\text{OH})_2$) δ 3,49 (2H, q, $J = 7,11$, HOCH_2CH_3) δ 2,31 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) δ 1,74 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) δ 1,02 (3H, t, $J = 7,18$, HOCH_2CH_3) ^{13}C NMR (D_2O) δ 177,01 (CO) δ 90,06 (CHO als Hydrat $\text{CH}(\text{OH})_2$) δ 57,45 (HOCH_2CH_3) δ 32,60 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) δ 29,58 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) δ 16,80 (HOCH_2CH_3)

4-Oxo-[4-³H]Butansäure (30c)

Die Herstellung erfolgt mit Tritium-markiertem γ -Ethoxybutyrolacton (**29c**). Eine Charakterisierung mit NMR-Spektroskopie wurde aufgrund der Tritiummarkierung nicht durchgeführt.

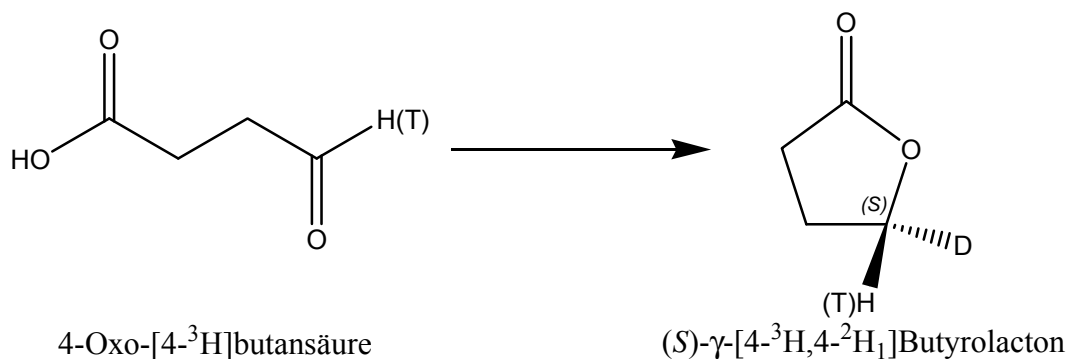
2.21.2 Enzymatische Substratsynthesen

(*R*)- γ -[4-³H, 4-²H₁]Butyrolacton (*R*4T-16)

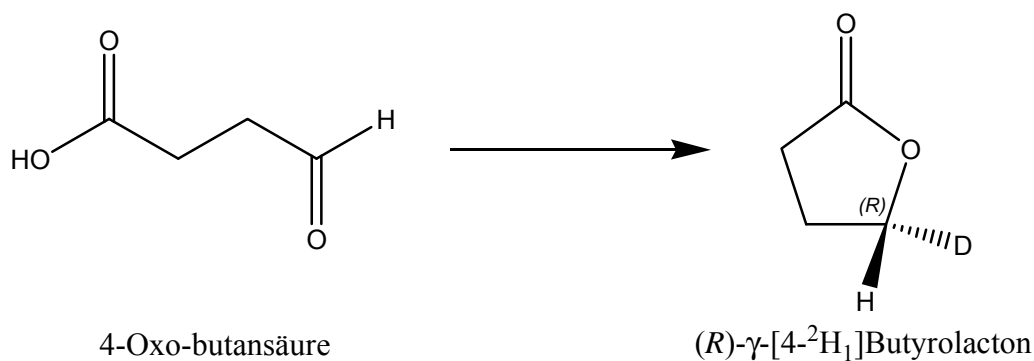


Zu einer wässrigen Lösung von 4-Oxo-[4-²H₁]butansäure (**30a**; 10 μ mol in 100 μ l) wurden Lösungen von NAD⁺ (0,25 μ mol; 10 μ l, 25 mM), Natrium[³H]formiat (0,01 μ mol; 20 μ Ci), unmarkiertes Natriumformiat (0,1 μ mol) und Formiatdehydrogenase (7 U) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4, 100 mM) in einer Kuvette (d = 1 cm) auf 1 ml verdünnt. Die Mischung wurde mit Kaliumphosphatpuffer verdünnt (100 mM, pH 7,4, ad 1ml). Sobald die Absorption bei 340 nm 0,8 erreicht hatte, wurde 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (0,8 U, während der Inkubationszeit schrittweise bis auf 4 U erhöht) hinzugegeben, worauf die Absorption auf 0,1 abnahm. Weitere Zugabe von unmarkiertem Natriumformiat (19 μ mol) und Formiatdehydrogenase stabilisierten die Absorption bei 0,6. Das Gemisch wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die vollständige Reduktion des Aldehyds wurde durch den erneuten Anstieg der Absorption angezeigt. Das Reaktionsgemisch wurde angesäuert und in Dichlormethan extrahiert (5 \times 3 ml), um das Lacton zu erhalten (9,72 μ mol, 116 μ Ci/mmol).

Dieselbe Reaktion wurde auch durchgeführt, indem 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase gegen Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Pferdeleber ersetzt wurde (3,75 μ mol, 53 μ Ci/mmol).

(S)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (S4T-16)

Die Reaktion wurde wie oben beschrieben mit 4-Oxo[4- ^3H]Butansäure (**30c**) und [$^2\text{H}_1$]Formiat im Ansatz durchgeführt. Die Reaktion wurde mit 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (Ausbeute: 60,6 μmol , spezifische Aktivität, 2 μCi / mmol) und Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (Ausbeute: 39 μmol , spezifische Aktivität 1,1 μCi / mmol) durchgeführt.

(R)- γ -[4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (R4D-16)

Die Reaktion wurde wie oben beschrieben mit 4-Oxo-Butansäure (**30b**; 147 μmol , 100 μl 15 prozentige wässrige Lösung) und [$^2\text{H}_1$]Formiat (1 mmol, 75 μl) im Ansatz durchgeführt. Die Ausbeute mit 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase betrug 18 mg (quantitativ). ^1H NMR (CDCl_3) δ 4,34 (1H, tt, $J = 7,05, 1,35$, CDHO) δ 2,50 (2H, td, $J = 8,12, 0,94$, CH_2COO) δ 2,26 (2H, qd, $J = 7,81, 0,94$, CH_2) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 176,66 (COO) δ 67,16 (t, $J = 23,12$, CDHO) δ 26,77 (CH_2COO) δ 21,05 (CH_2)

Chirale [^3H , $^2\text{H}_1$]Essigsäure (31a) aus (*R*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton

(*R*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (9,72 μmol , 116 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ erzeugt mit 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase) wird mit einer äquimolaren Menge an Natriumhydroxid zum Natriumsalz gespalten. Dieses wurde zusammen mit 2 μmol EDTA, 2 μmol DTE, 0,1 μmol Coenzym A, 0,1 μmol Acetylphosphat, 11,1 μmol NAD^+ und 0,5 μmol Acetylcoenzyme A in 1 ml 100 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4 aufgelöst. Die Reaktion wurde von einem teilweise gereinigten Enzympool aus *Acidaminococcus fermentas* (Buckel 1986), der Crotonase, (*S*)-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase, Thiolase und Phosphotransacetylase (0,2 mg Protein) enthielt, sowie von 0,6 U 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase und 0,5 U 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum* katalysiert (Abbildung 20 A). Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 12 h. Dannach wurde die produzierte Essigsäure bei pH 1 durch Dampfdestillation aus dem Gemisch entfernt. Das Kondensat wurde auf pH 10 gebracht und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck verdampft, um 4,9 μmol des Natriumsalzes zu erhalten (spezifische Aktivität 42 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). Dieselbe Reaktion wurde mit (*R*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (53 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$), welches mit Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber erzeugt wurde, durchgeführt und ergab 4,5 μmol Natriumacetat (spezifische Aktivität 11,1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$).

Ein Fehler bei der Abschätzung der spezifischen Aktivität tritt dadurch auf, dass der Reaktion 0,6 μmol einer Quelle von unmarkiertem Acetat in der Form von Acetyl-CoA und Acetylphosphat zugegeben worden waren. Die korrigierten spezifischen Aktivitäten, welche direkt auf die γ -Butyrolactone zurück geführt werden können, betragen 47 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ und 13 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$.

Chirale [^3H , $^2\text{H}_1$]Essigsäure (31b) aus (*S*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton

Dieselbe Abfolge von Reaktionen wurde für (*S*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton wiederholt. Für (*S*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton, erzeugt mit 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (4-HBDH) (60,6 μmol , spezifische Aktivität, 2 $\mu\text{Ci} / \text{mmol}$) ergab sich eine Ausbeute von 7,3 μmol (spezifische Aktivität, 1,1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$). Für (*S*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton, erzeugt mit Alkoholdehydrogenase (ADH) (39 μmol , spezifische Aktivität 1,1 $\mu\text{Ci} / \text{mmol}$), hingegen ergab sich eine Ausbeute von 12,1 μmol (spezifische Aktivität 0,5 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$).

2.21.3 Enzymatische Analyse der chiralen Essigsäure

Synthese von Malat aus chiraler Essigsäure

Acetyl-CoA-Synthase wurde genutzt, um aus dem durch Dampfdestillation gewonnenen Acetat Acetyl-CoA herzustellen. Dieses wurde in Anwesenheit von Glyoxylat durch die Malat-Synthase zu Malat (**32**) kondensiert. Zur Standardisierung der Tritiummarkierung wurde in diesem Schritt eine Markierung mit ^{14}C -Acetat eingeführt. Hierbei sollte für eine optimale Auswertung des relativen Tritiumgehalts in den späteren Schritten ein 3 zu 2 Verhältnis der absoluten Aktivitäten von Tritium zu ^{14}C hergestellt werden.

Die zu analysierende Probe (chirales Acetat + ^{14}C -Acetat) wurde in Basispuffer (2,2 ml, 100 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2) aufgenommen. Nun wurde Acetyl-CoA-Synthase (1 U) und Malat-Synthase (4 U) zugegeben und inkubiert (Raumtemperatur, 2 h). Nach erneuter Zugabe von Acetyl-CoA-Synthase (1 U) und Malat-Synthase (4 U) wurde die Reaktion weiter inkubiert (Raumtemperatur, 2 h). Die Isolierung des gebildeten Malats erfolgte über DOWEX-Anionenaustauscher (8×1 , 200 – 400 Mesh, Formiat-Form, 2 ml Säulenvolumen). Die in Wasser equilibrierte Säule wurde mit dem Reaktionsansatz beladen und nach Waschen mit Wasser (5 ml) mit Ameisensäure (5 M, 5 ml) eluiert. Die Lösung wurde eingedampft und danach in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4) resuspendiert. Nun wurde die Ausbeute enzymatisch durch Malatdehydrogenase (siehe Abschnitt 2.7.3) und durch Flüssigszintillationszählung bestimmt.

Für [^3H , $^2\text{H}_1$]Essigsäure aus (*R*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (ausgehend von ADH: 4,5 μmol , 11,1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$; ausgehend von 4-HBDH: 4,9 μmol , 42 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) betrug die Ausbeute an Malat 4,0 μmol (ausgehend von ADH, spezifische Aktivität nicht bestimmt) und 3,8 μmol (ausgehend von 4-HBDH: 17,8 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$).

Für [^3H , $^2\text{H}_1$]Essigsäure aus (*S*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton (ausgehend von ADH: 12,1 μmol , 0,5 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$; ausgehend von 4-HBDH: 7,3 μmol , 1,1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) betrug die Ausbeute an Malat 4,4 μmol (ausgehend von ADH, spezifische Aktivität nicht bestimmt) und 1,2 μmol (ausgehend von 4-HBDH: 0,9 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$).

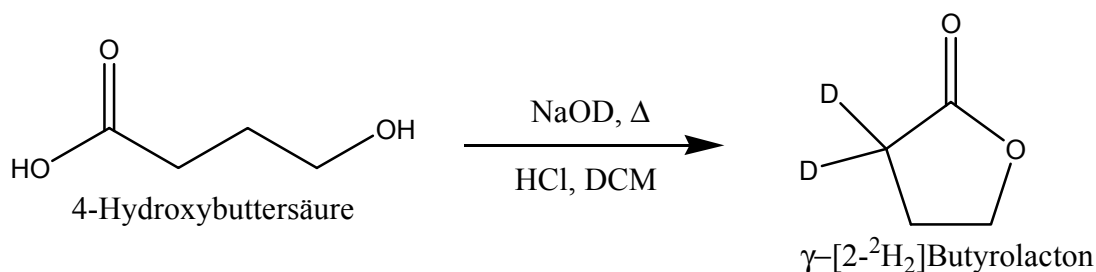
Analyse des [3-³H,²H₁]Malats mit Fumarase

Fumarase katalysiert die reversible Dehydratisierung von *S*-Malat zu Fumarat. Dabei wird ein Proton in *anti*-Position zur Hydroxyl-Gruppe von *S*-Malat eliminiert. Somit ist eine Bestimmung der Stereokonfiguration am C3 des Malats möglich.

Die zuvor in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,4, 1 ml) aufgenommenen Malatproben werden mit Fumarase (5 U, Boehringer Mannheim) für 3,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Proben eingedampft und resuspendiert, wobei dieser Vorgang dreimal wiederholt wird, um eventuell ins Wasser übergegangenes Tritium aus dem Gemisch zu entfernen. Zur Analyse wird darauf geachtet, die Volumina im Verhältnis zueinander (z.B. bei zuvoriger Probenentnahme) nicht zu verändern. Flüssigszintillatormessungen werden genutzt, um den ³H/¹⁴C-Gehalt in der Probe nach der letzten Resuspendierung zu ermitteln.

2.22 Untersuchungen zur Migration von Deuterium vom C2 von 4-Hydroxybutyryl-CoA zum C4 von Crotonyl-CoA

2.22.1 Synthese von γ-[2-²H₂]Butyrolacton (2D-16)



4-Hydroxybutyrat (Natrium Salz, 100 mg, 0,79 mmol) wurde in 10 M NaOD (1,5 ml) gelöst und in einem abgeschlossenen Gefäß für 24 h bei 99°C erhitzt. Nach Ansäuern (5 M HCL) auf pH 1 wurde das Gemisch über Nacht unter starkem Rühren in Dichlormethan (10 ml) extrahiert. Danach wurde nochmals in Dichlormethan extrahiert (3 × 10 ml), die organischen Phasen vereinigt, getrocknet (MgSO₄) und zum Produkt eingedampft (55 mg, 0,63 mmol, 80 % Ausbeute). ¹H-NMR (CDCl₃) δ 4,35 (2 H, t, *J* = 7,08, CH₂CH₂O) 2,48 (0,065 H, m, COOCD(H)₂) 2,26 (2 H, tp, *J* = 7,06, *J* = 1,15, COOCD₂CH₂CH₂O) ¹³C NMR (CDCl₃) δ 177,69 (COO) 68,47 (CH₂O) 27,21 (t, *J* = 20,52, COOCD₂) 21,98 (COOCD₂CH₂CH₂O)

2.22.2 Enzymatische Analyse mit γ -[2- $^2\text{H}_2$]Butyrolacton (2D-16)

Für den Reaktionsansatz wurde ein komplexes Enzymsystem, das aus 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase, 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, Butyryl-CoA-Dehydrogenase (aus *Clostridium tetanomorphum*) und Formiatdehydrogenase bestand, (*Candida boidinii*, Sigma-Aldrich) genutzt (Abbildung 38, Abschnitt 3.13). Der Versuch wurde in 4 ml Gesamtvolumen 50 mM Kaliumphosphat bei pH 7,4, welches 142,5 mM des zuvor hydrolysierten γ -[2- $^2\text{H}_2$]Butyrolactons, 1,25 mM Acetyl-CoA, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM DTE und ein katalytisches Reservoir von 10 mM freiem CoASH für die 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase enthielt, durchgeführt und für 18 h inkubiert. Zunächst wird dabei das markierte Substrat mit katalytischen Mengen Acetyl-CoA durch 2,5 U der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase zu 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_2$]butyryl-CoA und Acetat umgesetzt. Dieses wird nun durch 0,5 U der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zu Crotonyl-CoA dehydratisiert. Die Reduktion zu Butyryl-CoA durch die Butyryl-CoA-Dehydrogenase (4,5 U) entfernt dieses aus dem Gleichgewicht, indem das gebildete Butyryl-CoA als CoA-Donor für die Reaktion der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase genutzt werden kann. Da die Butyryl-CoA-Dehydrogenase durch hohe Konzentrationen an NADH gehemmt wird, darf die anfängliche Konzentration 100 μM nicht überschreiten. Um einen konstanten und vollständigen Umsatz zu gewährleisten, wurde ein System zur Regeneration von NADH aus NAD^+ und 0,7 mmol Natriumformiat durch 12,5 U der Formiatdehydrogenase benutzt. Alle beteiligten Enzyme, Substrate und Puffer waren anaerob, und die Reaktion wurde in einem anaeroben Zelt durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Ansäuern auf pH 1 abgestoppt und die enthaltenen Fettsäuren durch Wasserdampfdestillation abgetrennt. Die Vorlage enthielt 100 μl 1 M NaOH und vor Eindampfen des Kondensats wurde der pH-Wert auf 10 bis 12 eingestellt. Die erhaltenen Natriumsalze der wasserdampfgefährlichen Fettsäuren (Butyrat, 4-Hydroxybutyrat, Acetat) wurden mit ^1H - und ^2H -NMR-Spektroskopie charakterisiert, um den Gehalt und die Position der Deuteriummarkierung im Produkt Butyrat festzustellen.

3. Ergebnisse

3.1 Stereochemische Untersuchungen

Der postulierte radikalischer Mechanismus für die reversible Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA (Müh et al. 1997; Buckel und Golding 1999) beinhaltet drei potentiell stereoselektive Schritte:

1. Die Abstraktion des α -Protons von 4-Hydroxybutyryl-CoA
2. Die Übertragung des β -Protons vom Enoxy-Radikal-Intermediat auf Flavin
3. Die Eliminierung der Hydroxylgruppe und die anschließende Reprotonierung des planaren Intermediats zu Crotonyl-CoA

Für die Untersuchung von (1) und (2) wurden die prochiralen Zentren des 4-Hydroxybutyryl-CoA-Substrats an C2 und C3 stereospezifisch mit Deuterium markiert, siehe frühere Arbeiten zu C3 von (Scott et al. 2004).

Zur Analyse wurden die Substrat-Produktgemische massenspektrometrisch auf den Verbleib von Deuterium vor und nach der Reaktion mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase untersucht. In Kontrollversuchen auf spontanen Austausch der beteiligten Substrate mit dem Lösungsmittel wurden ohne Zugabe von Enzymen alle Schritte und Reaktionsbedingungen nachvollzogen. Dabei konnte stets das unveränderte Substrat wieder gewonnen werden. Alle im Folgenden dargestellten Massenänderungen der Substrate sind somit nicht von den experimentellen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Lösungsmittel H₂O oder D₂O) abhängig, sondern einzig auf die beteiligten Enzyme zurückzuführen.

Für die Charakterisierung von Substanzen im Massenbereich von CoA-Estern ist **Matrix assisted laser desorption ionisation – time of flight** Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) eine ideale Methode, da sie anders als andere massenspektrometrische Methoden (z.B. Ionenstoss-MS) erlaubt, die Substanzen unfragmentiert zu messen und direkt die Isotopenverteilung innerhalb einer Verbindung darzustellen. Abhängig von der zur Kristallisation der Probe und Übertragung der Laserenergie gewählten Matrix (hier: 4-Hydroxy- α -Cyano-Zimtsäure) können Proben unterschiedlicher Masse analysiert werden. Unterhalb einer von der Matrix abhängigen Grenze wird der Signalhintergrund durch

niedermolekulare Produkte photochemischer Reaktionen der Matrix für eine Auswertung zu hoch. Diese Matrixadukte können auch bisweilen Artefakte im Messbereich erzeugen.

Ein MALDI-TOF-MS Signal ist in der Regel aus einem Hauptsignal, das die monoisotopische Masse repräsentiert und mehreren Signalen schwererer Massen von abgestuft geringerer Intensität zusammengesetzt (+1, +2, +3 Da, etc.). Diese Signale repräsentieren den natürlichen statistischen Anteil der schwereren stabilen Isotope (z.B. ^{13}C , ^2H) in der gemessenen Substanz. Die bekannte natürliche Verteilung der Isotope ergibt z.B. für 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da) ein Signal bei 855 Da, welches statistisch 31,6 % (31,5 % für Crotonyl-CoA und Butyryl-CoA) der Signalstärke des monoisotopischen Signals aufweisen sollte. Sofern sich nun Überlagerungen von nebeneinander liegenden Signalgruppen von verschiedenen Substanzen ergaben, wurde jeweils der Anteil der leichtesten am Vergleich beteiligten monoisotopischen Masse genutzt, um den durch die natürliche statistische Verteilung der Elemente bedingten Anteil an den schwereren Signalen vor einem Vergleich herauszurechnen (vgl. Abschnitt 3.9 Ammonia-Lyase-Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase). Dazu wurde bei der Abschätzung des Gehalts an unmarkiertem 4-Hydroxybutyryl-CoA in einer Probe von 4-Hydroxy[$^2\text{H}_1$]butyryl-CoA zunächst das Integral für 854 Da (unmarkiert) bestimmt. Das Integral des Signals bei 855 Da (deuteriummarkiert) wurde um einen Anteil korrigiert, der 31,5 % des Integrals des Signals bei 854 Da beträgt, bevor ein Vergleich der beiden durchgeführt wurde. Generell ist darauf zu achten, dass die Integration von Signalen mit geringer Intensität aufgrund des Hintergrundrauschens relativ ungenau ist.

Zum Vergleich der Konfiguration der während der Reaktion der Dehydratase gebildeten Methylgruppe von Crotonyl-CoA mit der Hydroxylgruppe des Substrats 4-Hydroxybutyryl-CoA wurde ein Verfahren zur Analyse chiraler Methylgruppen über Essigsäure (Lüthy et al. 1969; Cornforth 1970) in einer modifizierten Variante (Pierik et al. 2002) angewendet. Hierfür wird eine stereoselektive Markierung mit Deuterium und Tritium in γ -Position von 4-Hydroxybutyryl-CoA sowie eine ^{14}C -Markierung als interner Standard benötigt.

3.1.1 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_1$]butyryl-CoA ausgehend von 3-Benzylxypropan-1-ol

Die chemische Synthese von γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton ausgehend von 3-Benzylxypropan-1-ol lieferte Produkte mit nahezu vollständiger Deuteriummarkierung (NMR, > 95 %). Diese

wurden zur Herstellung von 4-Hydroxybutyryl-CoA durch basische Hydrolyse des zunächst gespalten und dann enzymatisch auf Coenzym A übertragen. Die 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase die aus *Clostridium aminobutyricum* gereinigt werden konnte, ist ein 110 kDa Dimer (54 kDa pro Monomer) und katalysiert die Übertragung einer kurz bis mittelkettigen Fettsäure auf Coenzym A, wobei ein CoA-Donor in Form eines anderen CoA-Esters dabei gespalten wird (Scherf und Buckel 1991). Als Substrate sind bisher verschiedene Fettsäuren (Acetat, Vinylacetat, 4-Hydroxybutyrat, Butyrat, Propionat und 5-Hydroxyvalerat) bestimmt worden. Jedoch sind Crotonyl-CoA und 3-Hydroxybutyryl-CoA keine Substrate der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase (Scherf und Buckel 1991).

Je nach Reaktionsmechanismus können die CoA-Transferasen in drei Familien eingeteilt werden [(Heider 2001) und darin enthaltene Referenzen]. Enzyme der ersten Familie haben einen Ping-Pong Mechanismus, indem ein spezifischer Glutamatrest im aktiven Zentrum als Akzeptor für kovalent gebundene Zwischenstufen dient (Buckel et al. 1981; Selmer und Buckel 1999). Die CoA-Transferasen der zweiten Familie sind Teil der komplexen Citrat- oder α -Citramalat-Lyasen, die aus α -Untereinheit, CoA-Transferase; β -Untereinheit, Lyase; γ -Untereinheit und Acylcarrierprotein (ACP) aufgebaut sind. ACP wird enzymatisch zu einem Thioester acetyliert, um das Enzym zu aktivieren. Die α -Untereinheit tauscht die Acylgruppe über einen ternären Komplex ohne substratgebundene Zwischenstufen mit Citrat oder Citramalat aus. Bei gleichzeitiger Enzymbindung beider Substrate entsteht dabei ein gemischtes Anhydrid der beiden Säuren. Die γ -Untereinheit spaltet Oxalacetat oder Pyruvat von Citryl- oder Citramalyl-ACP ab und regeneriert so Acyl-ACP (Buckel et al. 1971; Buckel und Bobi 1975; Dimroth und Eggerer 1975). Die Enzyme der dritten Familie haben keine Sequenzähnlichkeiten mit schon bekannten Transferasefamilien. Sie katalysieren den Austausch ebenfalls über einen ternären Komplex benutzen dabei aber CoA-Thioester als Substrate (Dickert et al. 2000; Leutwein und Heider 2001).

Untersuchungen der kinetischen Parameter der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus *Clostridium aminobutyricum* erlaubten keine Zuordnung zu einer der Familien (Friedrich 2003). Jedoch ermöglichte die Aufklärung der Kristallstruktur die Zuordnung zur ersten Familie, da neben großen strukturellen Ähnlichkeiten ein Glutamatrest im aktiven Zentrum nachgewiesen werden konnte (Macieira et al. 2008).

Für den Transfer von 4-Hydroxy[2- 2 H₁]butyrat wurde Acetyl-CoA als Donor verwendet und so die Produkte (S)-4-Hydroxy[2- 2 H₁]butyryl-CoA und (R)-4-Hydroxy[2- 2 H₁]butyryl-CoA gewonnen. Die benutzten Substrate zeigten (Abbildungen 7 A und 8 A) eine monoisotopische Masse von 855 Da sowie eine weniger vollständige Markierung (< 10 %, 854 Da,

unmarkiertes 4-Hydroxybutyryl-CoA) als durch eine Synthese aus Methionin (Abschnitt 3.1.2) erreicht werden konnte. Dies ist abhängig von dem verwendeten Reduktionsmittel (LiAlD_4), welches zum Einbringen der Deuteriummarkierung in der Synthese verwendet wurde und nur 96 % Deuterium enthält. Dieser Befund ist konsistent mit NMR-Spektroskopie, die mehr als 95 % Vollständigkeit der Deuteriummarkierung in den Lactonvorstufen zeigte. Die absolute Konfiguration der Substrate wurde nach Oxidation zu $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Bernsteinsäure}$ mit CD-Spektroskopie im Vergleich zur Literatur bestätigt (Listowsky et al. 1970) (Abschnitt 3.5).

Bei der Verwendung des *S*-Isomers als Substrat verblieb nach Inkubation mit Dehydratase die Markierung in (*S*)-4-Hydroxy $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{butyryl-CoA}$ (855 Da) und dem gebildeten $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Crotonyl-CoA}$ (837 Da) erhalten. Der Vergleich der Integrale des Edukts mit denen des Produktgemisches ergab keine Änderung des Anteils an unmarkierten 4-Hydroxybutyrat (854 Da) vor und nach der Reaktion (Abbildung 7). Bei der Verwendung von (*S*)-4-Hydroxy $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{butyryl-CoA}$ ausgehend von Methionin konnte jedoch eine Zunahme beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.1.2, Abbildungen 9A und 9 B).

Die Gegenprobe mit (*R*)-4-Hydroxy $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{butyryl-CoA}$ als Substrat führte zu einem vollständigen Verlust der Markierung. Die monoisotopischen Massen der Produkte 4-Hydroxybutyrat (854 Da) und Crotonyl-CoA (836 Da) zeigten eine nur die natürliche Verteilung von schwereren Isotopen (^{13}C , ^2H , etc.; Abbildung 8 B).

Anders als bei der Synthese ausgehend von Methionin (Abschnitt 3.1.2) waren kein teilweiser Verbleib (*R*-Isomer) oder teilweise Entfernung (*S*-Isomer) der Markierung feststellbar. Somit ist es als unwahrscheinlich anzusehen, dass eine Racemisierung durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase stattfindet. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Syntheseansatz über 3-Benzoyloxypropan-1-ol und ALPINE-BORANETM enantiomerenrein ist.

Eine Charakterisierung der Markierung auf der Stufe der chiralen Alkohole wurde über die Änderung der chemischen Verschiebung des NMR-Signals der markierten Gruppe durch Verwendung chiraler Shift-Reagenzien versucht. Da eine Bestimmung der Enantiomerenreinheit und absoluten Konfiguration über Mosher's-Ester für 2-Benzoyloxyethanol bereits erfolgreich durchgeführt werden konnte (Speranza et al. 2003), wurde dieses Verfahren auch hier angewendet. Es führte aber zu keinem klar auswertbaren Ergebnis, da die Signale der Benzoyloxyether-Gruppe und der markierten Gruppe im

Mosherester sich überlagern, so dass eine Integration nicht möglich ist (siehe NMR-Spektroskopie, Abschnitt 3.4.2). Eine Anwendung dieses Verfahrens auf die chiralen Lactone schlug fehl, da die verwendeten Mosher-Säurechloride sehr feuchtigkeitsempfindlich und die Substrate hygroskopisch sind. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde CD-Spektroskopie mit den zu Bernsteinsäure oxidierten γ -[2- $^2\text{H}_1$]Lactonen durchgeführt. So konnte die angenommene absolute Konfiguration für die Synthese ausgehend von 3-Benzylxypropan-1-ol bestätigt werden. Wurden die CD-Daten dieser enantiomerenreinen Synthese mit denen der Synthese ausgehend von Methionin verglichen, so konnte die Enantiomerenreinheit für die zweite Synthese auf 82,5 % Reinheit für das 2*S*-Isomer und 91,3 % Reinheit für das 2*R*-Isomer bestimmt werden (Abbildung 19, Tabelle 2).

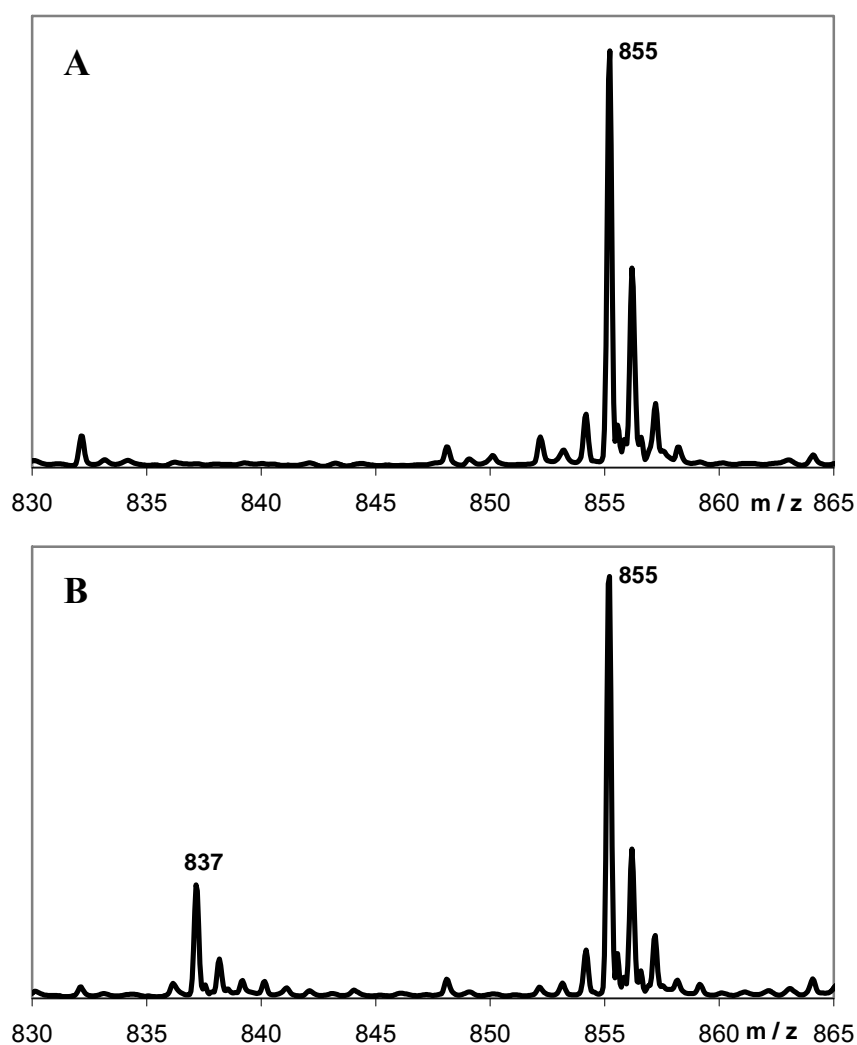


Abbildung 7. MALDI-TOF-MS. **A.** Ausgangssubstrat: (*S*)-4-Hydroxy [2- $^2\text{H}_1$]butyryl-CoA (855 Da; ausgehend von *S*-ALPINE BORANETM) und 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da; ca. 10 %). **B.** Nach Equilibrierung mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: [2- $^2\text{H}_1$]Crotonyl-CoA (837 Da) mit gleichbleibendem Anteil an unmarkierten Substraten bei 836 Da (Crotonyl-CoA) und 854 Da (4-Hydroxybutyryl-CoA; ca. 10 %) (Friedrich et al. 2008a; Friedrich et al. 2008b)

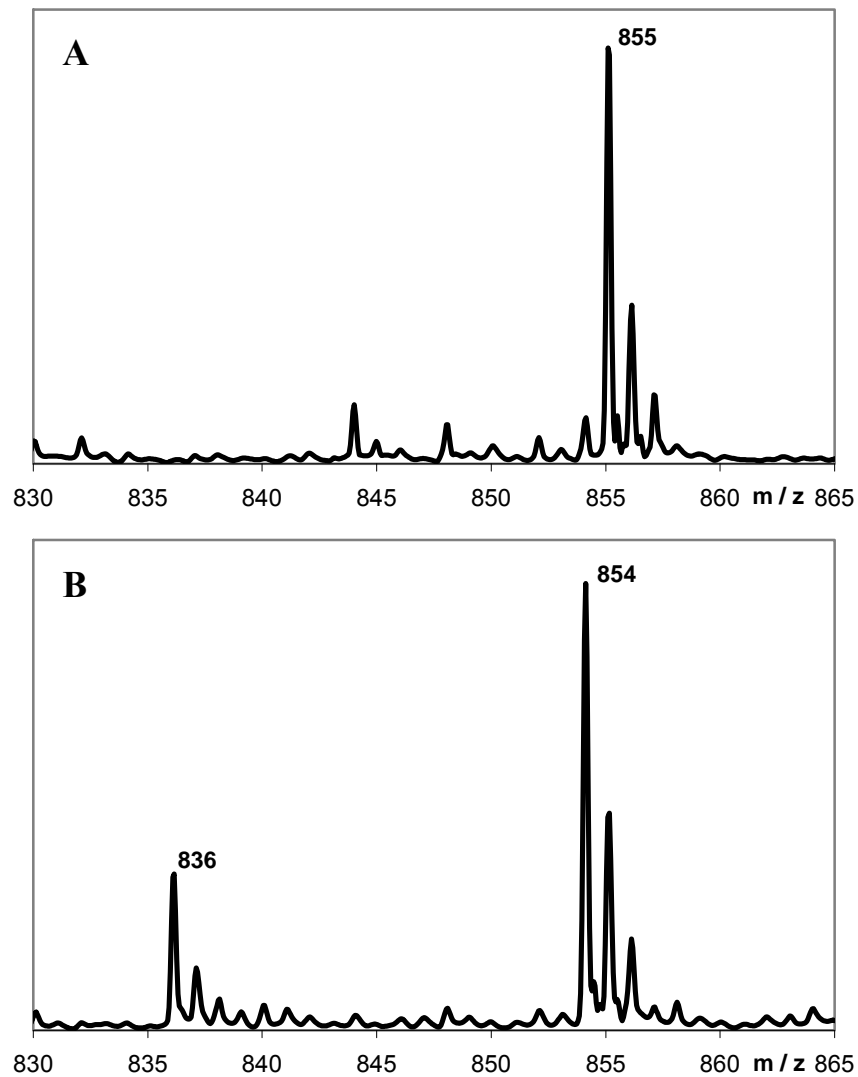


Abbildung 8. MALDI-TOF-MS. **A.** Ausgangssubstrat: (*R*)-4-Hydroxy [2-²H₁]butyryl-CoA (855 Da; ausgehend von *R*-ALPINE BORANE™) und 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da; ca. 10 %) **B.** Nach Equilibrierung mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da) und Crotonyl-CoA (836 Da) ohne signifikanten Verbleib der Markierung in Produkt oder Edukt (erhöhte Signalintensität bei 837 bzw. 855 Da). (Friedrich et al. 2008a; Friedrich et al. 2008b)

3.1.2 Methionin als Vorstufe von 4-Hydroxy[2-²H₁]butyrat

Die chemische Synthese ausgehend von Methionin ergab (*R*)- und (*S*)- γ -[2-²H₁]Butyrolacton mit einer zu 98 % vollständigen Deuteriummarkierung (nach NMR). Die Lactone wurden durch Hydrolyse und anschließenden Transfer mit Acetyl-CoA durch die 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase in (*S*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA und (*R*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA umgewandelt. Durch die Integrale der MALDI-TOF Massenspektren konnte bestätigt werden, dass der Anteil an Deuterium im 4-Hydroxy[²H₁]butyryl-CoA bei ca. 95 % (855 Da) liegt (Abbildungen 9 A und 10 A).

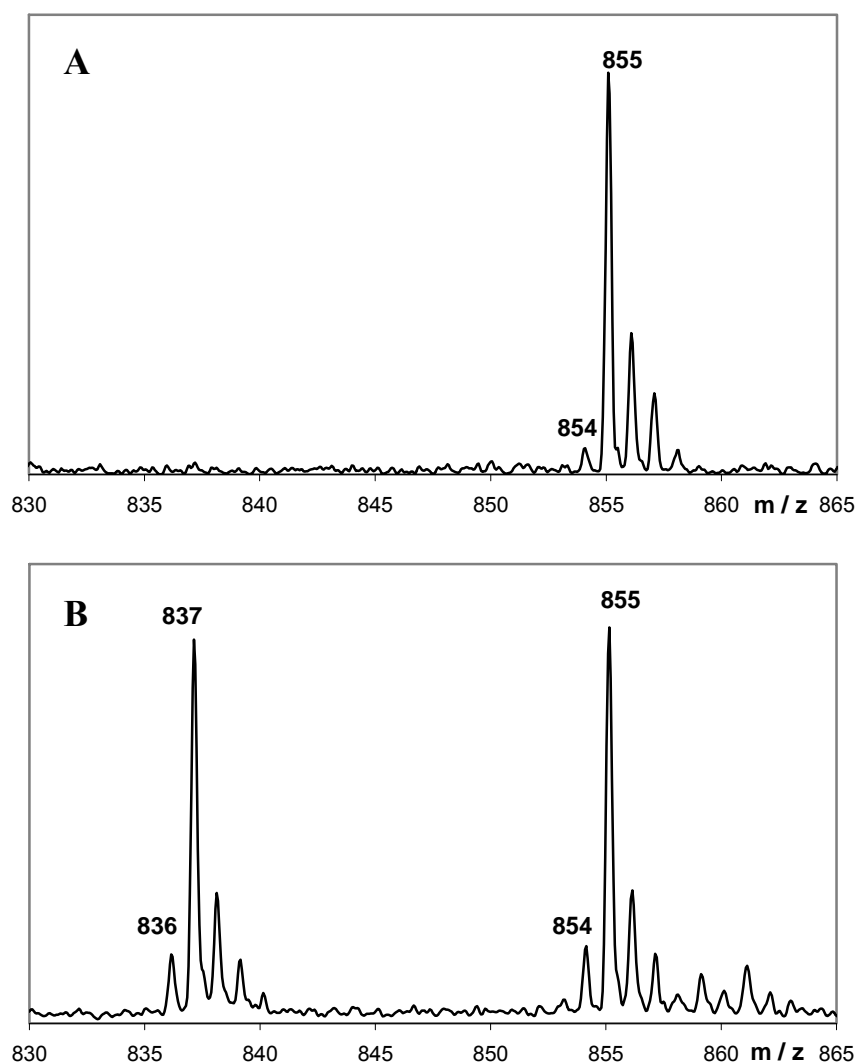


Abbildung 9. MALDI-TOF-MS. **A.** Ausgangssubstrat: (*S*)-4-Hydroxy [2-²H₁]butyryl-CoA (855 Da; ausgehend von Methionin) und 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da; ca. 5%) **B.** Nach Equilibrierung mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: [2-²H₁]Crotonyl-CoA (837 Da) und einer Zunahme des Anteils an unmarkierten Substraten bei 836 Da (Crotonyl-CoA) und 854 Da (4-Hydroxybutyryl-CoA) auf ca. 15 %.

Nach Reaktion mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zeigte sich für die Substrate ausgehend von Methionin ein nicht eindeutiges Ergebnis. In der Tendenz wurde für (*S*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA als Substrat eine Retention der Markierung im Produktgemisch gefunden. Nach der Reaktion traten mehrheitlich monodeuteriertes 4-Hydroxybutyryl-CoA (855 Da) und Crotonyl-CoA (837 Da) auf (Abbildung 9 B). Die zusätzlich auftretenden Signale bei 836 Da und 854 Da weisen auf unmarkiertes Substrat hin. Der Vergleich der Integrale der monoisotopischen Masseverteilung bei 855 zu 854 Da vor und nach der Reaktion weist auf eine Zunahme des unmarkierten Anteils von 5 % auf 15 % hin. Somit muss das Edukt einen Anteil von ca. 10 % des *S*-Isomers enthalten haben, dessen Markierung mit dem Wasser ausgetauscht wurde.

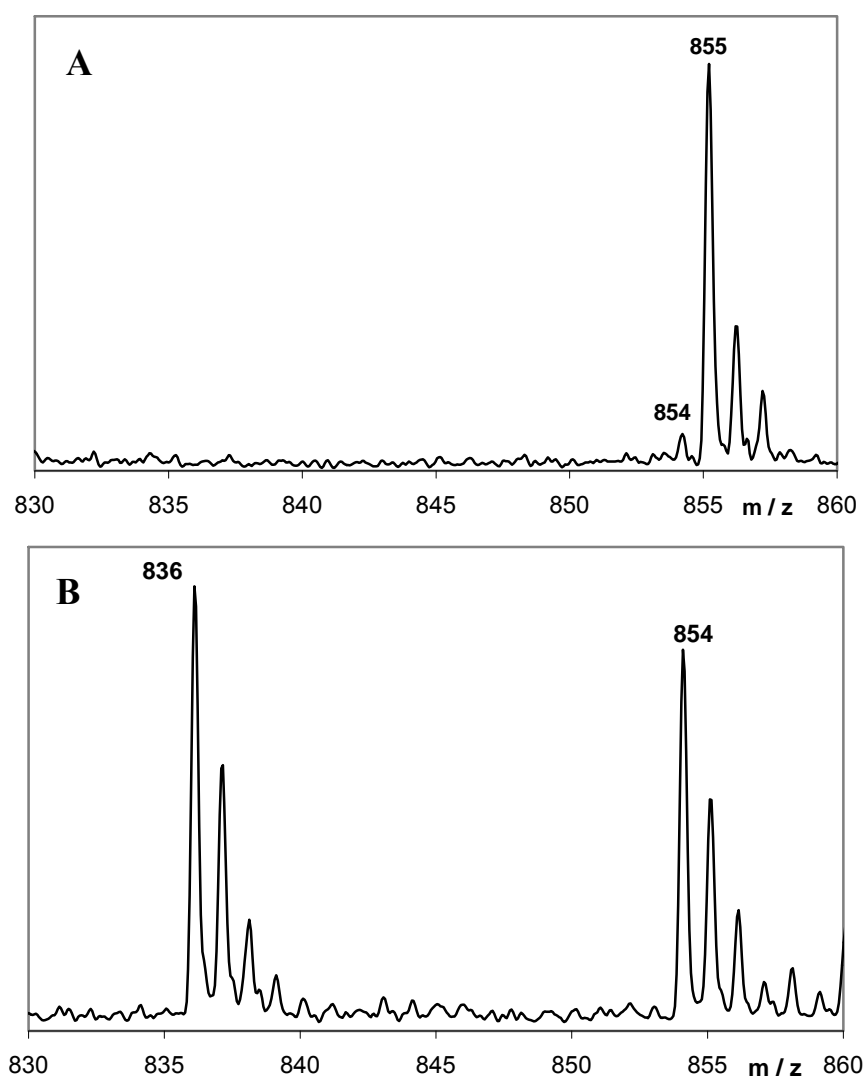


Abbildung 10. MALDI-TOF-MS. **A.** Ausgangssubstrat: (*R*)-4-Hydroxy [2-²H₁]butyryl-CoA (855 Da; ausgehend von Methionin) und 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da ca. 5 %). **B.** Nach Equilibrirung mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da) und Crotonyl-CoA (836 Da) mit einem 20 prozentigen Verbleib der Markierung (Erhöhte Signalintensität durch Signalüberlagerung bei 837 bzw. 855 Da).

Für (*R*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA führte die Reaktion mit Dehydratase zu einem Substrat-Produktgemisch, in dem der überwiegende Teil der Markierung ausgetauscht werden konnte. Die Isotopenverteilungen von Crotonyl-CoA (836 Da, 837 Da) sowie 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da, 855 Da) weichen von der statistischen Verteilung ab (Abbildung 10 B). Wird die statistisch erwartete natürliche Isotopenverteilung der Signale im Produktgemisch mit der erhaltenen verglichen, kann ein ca. 20 prozentiger Verbleib der Markierung nach Reaktion mit Dehydratase sowohl in 4-Hydroxybutyryl-CoA (855 Da) als auch in Crotonyl-CoA (837 Da) nachgewiesen werden.

Zur Absicherung dieser Resultate wurden die Ausgangslactone zu Bernsteinsäure oxidiert und deren angenommene absolute Konfiguration über CD-Spektroskopie im Vergleich mit der Literatur (Listowsky et al. 1970) bestätigt (Abschnitt 3.5). Durch die Integration der MALDI-TOF-MS-Signale muss von einer Synthese ausgegangen werden, die 10 – 20 % (Abbildungen 9 B und 10 B) des jeweilig anderen Stereoisomers enthält. An dieser Stelle konnte ohne enantiomerenreine Referenzprobe (später durch die Synthese über 3-Benzylxypropan-1-ol gegeben) noch keine genaue Bestimmung des Gehalts an (*R*)- und (*S*)-Isomeren für die Synthese ausgehend von Methionin durchgeführt werden.

Zunächst wurde nun versucht, die Stereoselektivität der Synthese direkt nach erfolgter Markierung zu untersuchen. Zur genaueren Charakterisierung der Zwischenprodukte nach der Eliminierung des Broms wurde die Synthese abgeändert und (*R*)-[2-²H₁]Buttersäure aus L-Methionin über Desulfurierung durch Raney-Nickel-Katalysator hergestellt (Mozingo et al. 1943). Diese wurde mit Acetyl-CoA und 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase zu (*R*)-[2-²H₁]Butyryl-CoA umgesetzt. Nun konnte die *S*-Stereospezifität von Crotonase für den Austausch eines α -Protons von Butyryl-CoA ausgenutzt werden (D'Ordine et al. 1994; Engel et al. 1998; Kiema et al. 1999), um die absolute Konfiguration und Enantiomerenreinheit der Synthese ausgehend von Methionin zu bestimmen.

Raney-Nickel ist ein Katalysator, der für die Hydrierung von ungesättigten Kohlewasserstoffen und außerdem für die Spaltung von Thioethern verwendet werden kann. Hierbei wird die Methylthiogruppe von 4-Methylthio[2-²H₁]buttersäure gegen ein Wasserstoffatom ersetzt. Es wird weiterhin davon ausgegangen, dass während der Reaktion die Konfiguration am C2 unverändert erhalten bleibt. Ein Vergleich mittels NMR-Spektroskopie zeigte für die in wässriger Umgebung ausgeführte Reaktion keinen geringeren

Deuteriumgehalt im Produkt (*R*)-[2-²H₁]Buttersäure als im Ansatz ohne Raney Nickel (¹H-NMR (H₂O) δ 2,01 (1H, m, CDH); Fehler 5%).

Zu testendes (*R*)-[2-²H₁]Butyryl-CoA (839 Da, < 5 % unmarkiert) wurde mit 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus Acetyl-CoA und (*R*)-[2-²H₁]Butyrat hergestellt. Versuche einer Reaktion mit Crotonase ohne die vorherige Entfernung von unreagiertem Acetyl-CoA schlugen fehl, da es sich als starker Inhibitor der Crotonase erwies (Furuta et al. 1980). Nach der Entfernung von Acetyl-CoA über Citrat-Synthase ohne die Anwesenheit von 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase konnte reines Butyryl-CoA gewonnen werden.

Eine Inkubation mit Crotonase in D₂O ergab eine Mischung (53 zu 47) aus (*S*)-[2-²H₁]Butyryl-CoA (839 Da) und [2-²H₂]Butyryl-CoA (840 Da). Eine Reinigung der Produkte und deren erneute Inkubation mit Crotonase unter denselben Bedingungen ergab keine weitere nennenswerte Verschiebung des Verhältnisses der beiden Produkte (Signalverhältniss 839 zu 840 Da, Abbildung 11 A). Die Reaktion war somit vollständig abgelaufen und ergab einen zusätzlichen Einbau von Deuterium in 47 % des Substrats.

Dieselbe Abfolge von Reaktionen durchgeführt in H₂O ergab nach zweimaliger Inkubation mit Crotonase ein Gemisch (46: 54) von unmarkiertem Butyryl-CoA (838 Da) und (*R*)-[2-²H₁]Butyryl-CoA (839d) (Abbildung 11 B). Eine Kontrollreaktion mit unmarkiertem Butyryl-CoA in D₂O zeigt nur einen Einbau von einem Deuterium (Abbildung 12 A). Da Crotonase spezifisch für einen Austausch an der 2*Si*-Position von Butyryl-CoA ist, müsste bei enantiomerenreiner Synthese in D₂O eine vollständige Doppelmarkierung und in H₂O eine kompletter Verlust der Markierung zu beobachten sein.

Dieses Resultat deutet auf komplette Racemisierung hin. Diese ist jedoch nicht konsistent mit den zuvor gefundenen 10 – 20 % (Signalverhältniss, Abbildungen 9 B und 10 B) des jeweils anderen Stereoisomers. Somit ist durch die Reaktion mit Raney Nickel eine zusätzliche Racemisierung aufgetreten, weshalb über dieses Verfahren die Enantiomerenreinheit und absolute Konfiguration der Synthese ausgehend von Methionin nicht geklärt werden kann.

Dies ist in sofern bemerkenswert, da die Reaktion mit Raney-Nickel Katalysator in wässriger Umgebung stattfand und unter diesen Bedingungen ein Austausch mit dem Lösungsmittel anstatt einer Racemisierung erfolgen müsste. Denkbar wäre ein Komplex des Ni-Atoms mit dem Carbonyl-Sauerstoff von Butyrat, der ein Enoxy-Butyrat Intermediat zur Folge hätte und ein α-Proton abspalten könnte. Eine anschließende Reprotonierung würde daraufhin zur Auflösung der Δ²-Doppelbindung führen. Dieses Modell hätte bei wiederholter Anwendung

jedoch stets einen Komplettaustausch zur Folge; es sei denn, es würde ein sehr hoher kinetischer Isotopeneffekt des Deuteriums angenommen und somit Wasserstoff bevorzugt entfernt. Dieser müsste jedoch so hoch sein, dass ein Austauschereignis von Deuterium praktisch nicht auftritt (innerhalb der durch NMR und MALDI-TOF-MS gegebenen Messungenauigkeiten). Daher wird angenommen, dass ein Übergangszustand mit Nickel ohne die Möglichkeit eines Austauschs mit Wasser die Position beider α -Protonen ändern kann.

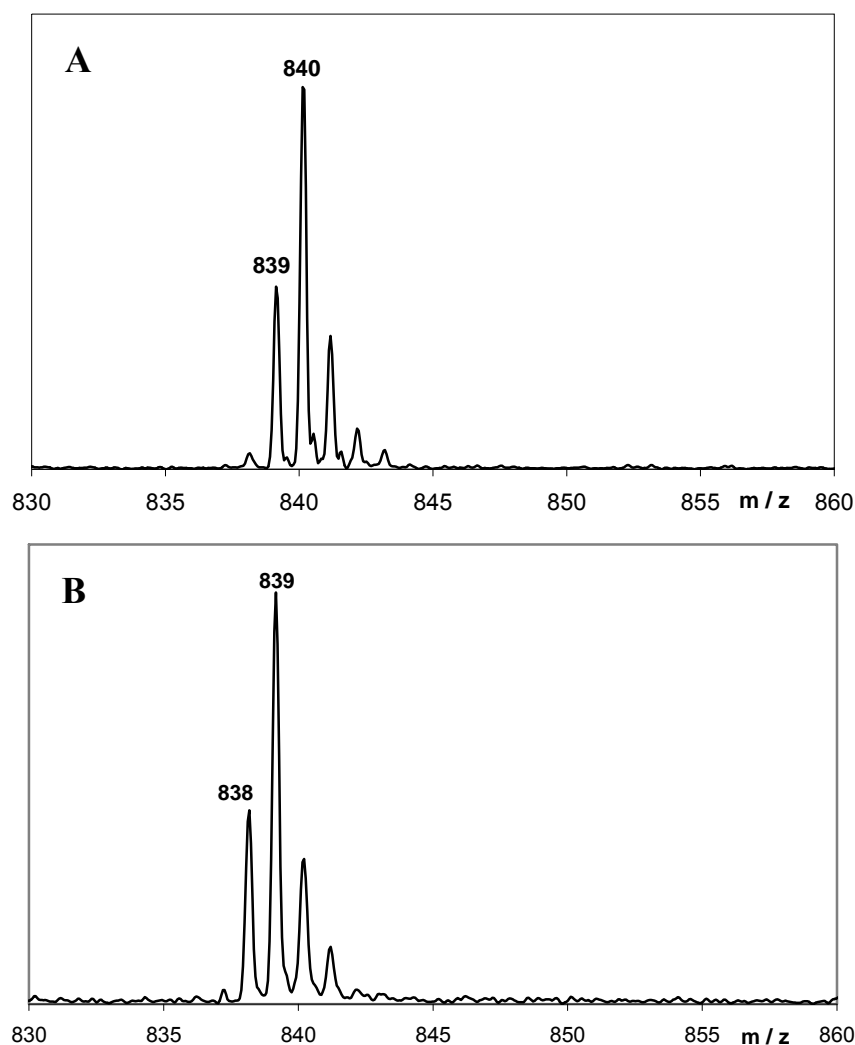


Abbildung 11. MALDI-TOF-MS. Test auf *R*-Konfiguration von $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ (839 Da; Raney-Nickel-Synthese) mit Crotonase: **A.** in D_2O ergibt 53 % (*S*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Butyryl-CoA}$ (839 Da) und 47 % $[2\text{-}^2\text{H}_2]\text{Butyryl-CoA}$ (840 Da); **B.** in H_2O ergibt 54 % unverändertes Substrat (839 Da) und 46 % unmarkiertes Butyryl-CoA (838 Da). Das Syntheseprodukt ist ein Racemat.

Weitere Versuche, die Enantiomerenreinheit auf der Stufe der Lactone zu untersuchen, wurden über NMR Experimente mit chiraler Verschiebung durchgeführt (Abschnitt 3.4); hierbei erwies es sich jedoch als schwierig, auswertbare Spektren zu erhalten. Die Einführung eines zweiten chiralen Zentrums in die Endprodukte (4-Hydroxybutyrat) über die Bildung

chiraler Amide (Abbildung 13, Abschnitt 3.4.1,) zeigte keine Basislinientrennung der Signale für *R*- und *S*-Isomere und konnte somit auch nicht zur Bestimmung des Isomerenverhältnisses genutzt werden. Deshalb wurde ein Versuch über einen chiralen Europium-Kampfer Liganden zur Koordination mit den zu testenden γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolactonen durchgeführt. Hier zeigte sich eine je nach Isomer unterschiedlich ausgeprägte Verschiebung, aber diese war nicht genau zu quantifizieren (siehe Abschnitt 3.4.3). Dies lieferte jedoch ein weiteres Indiz dafür, dass die Synthese über Methionin überwiegend stereospezifisch abläuft. Es zeigte sich in ^2H -NMR-Messungen, dass nur das Isomer mit der höchsten Konzentration ein Signal erzeugt (Abbildung 18). Im ^1H -NMR wurde zwar eine für eine Basislinientrennung ausreichende Verschiebung der Signale erzeugt, aber die Überlagerung mit Hintergrundsignalen des Shift-Reagenz überlagert verhinderte deren getrennte Integration (Abbildung 17). Ein dritter Versuch, über Mosher Säure-Ester mit 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_1$]butyrat einen Zugang zu auswertbaren NMR-Spektren zu erhalten, hatte ebenfalls keinen Erfolg (Abschnitt 3.4.2.2).

Somit bleibt immer noch die Frage zu klären, worauf die Isomerengemische, die durch MALDI-TOF-MS gefunden wurden, zurückzuführen sind. Eine partielle Racemisierung während der enzymatischen Katalyse ist unwahrscheinlich, da sie zu einem kompletten Austausch des Deuteriums mit dem Wasser geführt hätte. Daher würde eine nicht enantiomerenreine Synthese die Resultate besser erklären.

Zur weiteren Charakterisierung der Synthese ausgehend von Methionin und zur zweifelsfreien Bestimmung der Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde ein zweiter Syntheseweg beschritten (Abschnitte 4.1.1, 3.1.1 und 2.20.2). Die daraus hervorgehenden Produkte wurden als Referenz für CD-spektroskopische Messungen und als Substrate in der Reaktion mit Dehydratase genutzt. Die Enantiomerenreinheit konnte so für die Synthese ausgehend von Methionin auf 82,5 % (*2S*) bis 91,3 % (*2R*) bestimmt werden (Abbildung 19, Tabelle 2).

3.3 Dehydrogenaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und Stereoselektivität der Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *C. aminobutyricum*

Die Aufklärung der Kristallstruktur der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase offenbarte große strukturelle Übereinstimmungen mit der Butyryl-CoA-Dehydrogenase (Martins et al. 2004). Es war daher anzunehmen, dass die Dehydratase auch Dehydrogenaseaktivität besitzt. Das Modell für die Bindung von 4-Hydroxybutyryl-CoA durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-

Dehydratase ist von der bekannten Substratbindung durch Butyryl-CoA-Dehydrogenase abgeleitet (Ghisla und Thorpe 2004; Kim und Miura 2004). Daher wird vermutet, dass die vergleichbaren Teilreaktionen beider Enzyme mit der gleichen Stereoselektivität ablaufen. Daher wurde die α -Proton-Abstraktion an Butyryl-CoA durch die Dehydratase getestet.

Die für dieses Experiment verwendete aus *C. aminobutyricum* gereinigte 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde aufgrund der Befunde auf Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität getestet. Unglücklicherweise konnte die in den verwendeten Enzymproben festgestellte Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität nicht eindeutig der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zugeschrieben werden. Über eine weitere Reinigung über UNO-Q-Säulenchromatographie konnte eine Trennung der Dehydratase- von der Dehydrogenaseaktivität erreicht werden. Weiterhin konnte in einer Präparation mittels Reinigung über Strep-Tag aus *Escherichia coli* gewonnener 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (J. Zhang, persönliche Mitteilung) keine Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität nachgewiesen werden. Ein Umsatz von rekombinant gewonnener Dehydratase mit Butyryl-CoA in D₂O zeigte keine mit MALDI-TOF-MS nachweisbaren deuterierten Produkte, die auf Austausch der α -Protonen hinweisen würden.

Da die Equilibrierungsversuche (Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) in dieser Arbeit möglicherweise durch eine Verunreinigung mit Butyryl-CoA-Dehydrogenase verfälscht werden könnten, wurde die partiell gereinigte Enzymmischung auf ihre Stereoselektivität hin untersucht. Bei Entfernung der Butyryl-CoA-Dehydrogenase kann kein signifikanter Deuteriumaustausch von (S)-[2-²H₁]Butyryl-CoA mit dem Lösungsmittel beobachtet werden (Spektrum nicht gezeigt).

Der Nachweis der Stereoselektivität für den Austausch der α -Protonen von Butyryl-CoA erfolgt über (S)-[2-²H₁]Butyryl-CoA [stereospezifisch mit Crotonase in D₂O hergestellt (D'Ordine et al. 1994)]. Dieses hat eine Masse von 839 Da und enthält ca. 11 % unmarkiertes Butyryl-CoA (Abbildung 12 A). Bei Inkubation von unmarkiertem Butyryl-CoA (838 Da) mit dem Lösungsmittel D₂O unter Reaktionsbedingungen (pH 8,5, Spektrum nicht gezeigt) und den Bedingungen der Reinigung über C18-Säulen (pH 1,5, Spektrum nicht gezeigt) konnte kein Austausch nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund dieser Kontrollen auf spontanen Austausch wurde mit Crotonase erzeugtes (S)-[2-²H₁]Butyryl-CoA (839 Da, Spektrum nicht gezeigt vgl. Abbildung 12 A) mit dem partiell gereinigten Enzymgemisch (enthält Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität) in H₂O und in D₂O umgesetzt.

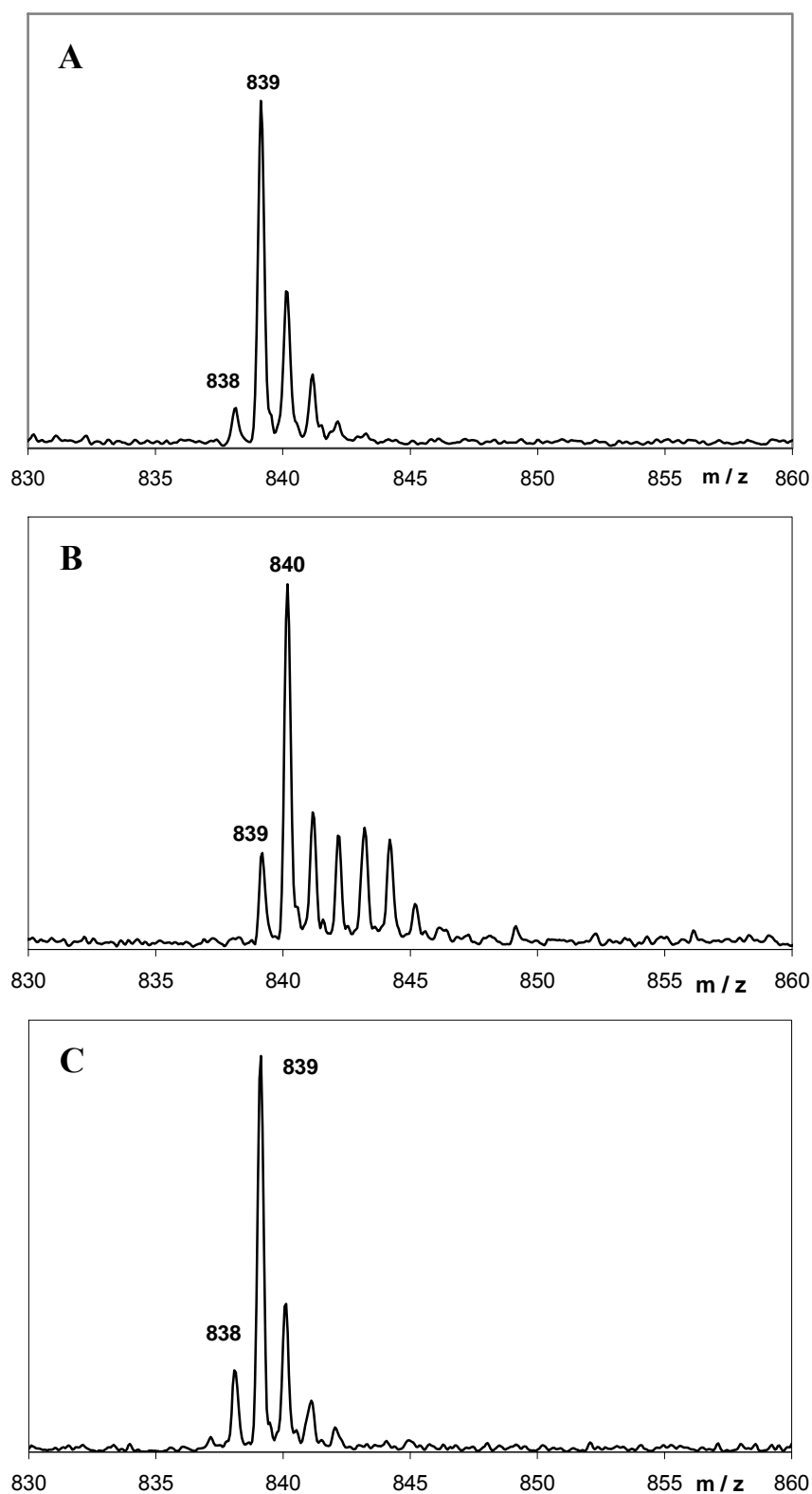


Abbildung 12. MALDI-TOF-MS. **A.** Ausgangssubstrat durch Markierung mit Crotonase in D_2O : (*S*)-[2- 2H_1]Butyryl-CoA (939 Da) und unmarkiertes Butyryl-CoA (838 Da, 11 %). **B.** Equilibrierung mit partiell gereinigter 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in D_2O : [2- 2H_2]Butyryl-CoA (840 Da), (*R*)-[2- 2H_1]Butyryl-CoA und ein Matrix-Artefakt bei 843 Da ohne Einfluss auf den Vergleich der Signale bei 839 und 840 Da. **C.** Equilibrierung mit partiell gereinigter 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in H_2O : keine signifikante Massenänderung.

In H₂O ergab sich keine Massenänderung des monoisotopischen Massenpeaks bei 839 Da und kein messbarer Anstieg des Gehalts an unmarkiertem Butyryl-CoA (838 Da, Abbildung 12 C). Dagegen ergab eine Inkubation in D₂O eine Massenzunahme auf 840 Da ([2-²H₂]Butyryl-CoA) (Abbildung 12 B) und einen Deuteriumeinbau (+1 Da) in das vormals unmarkierte Butyryl-CoA (*R*-[2-²H₁]Butyryl-CoA, 839 Da). Vergleicht man das erhaltene Verhältnis der Massen (840 Da / 839 Da) mit dem vor der Reaktion (Spektrum nicht gezeigt vgl. Abbildung 12 A, 839 Da / 838 Da), so ist das Integral des Signals bei 839 Da nach der Reaktion ca. 5 % größer und deutet somit auf eine nicht ganz vollständige Umsetzung mit der Enzymprobe hin.

Eine Racemisierung durch Crotonase oder durch die Enzympräparation ist hierbei auszuschließen, da dieser Effekt nicht in H₂O auftritt. Hierbei müsste dann bei einer Racemisierung durch Crotonase der Anteil an unmarkiertem Butyryl-CoA ansteigen. Eine Racemisierung durch die Enzymprobe würde bei genügend langer Inkubation in D₂O eine vollständige doppelte Markierung und in H₂O einen kompletten Verlust der Markierung bedeuten. Die erhaltenen Massenänderungen zeigen eine *Re*-Stereoselektivität der verwendeten Enzymprobe.

Somit lassen die Ergebnisse aber einen Rückschluss auf die Stereoselektivität der Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *C. aminobutyricum* zu. Da bei einer Inkubation von (*S*)-[2-²H₁]Butyryl-CoA in D₂O nur eine Massenänderung von 1 Da und in H₂O keine Änderung stattfand, ist davon auszugehen, dass alle beteiligten Enzyme dieselbe Stereoselektivität für einen Protonenaustausch am C-2 von Butyryl-CoA haben. Da zusätzliche Versuche mit hochgereingter 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase keinerlei Austausch ergaben, kann für die Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *C. aminobutyricum* *Re*-Stereoselektivität bei der Abstraktion des α -Protons angenommen werden. Wie von strukturellen Ähnlichkeiten abgeleitet haben beide Enzyme für die Abstraktion der α -Protonen ihrer jeweiligen natürlichen Substrate die gleiche Stereoselektivität, so dass bei Verunreinigungen der Equilibrierungsexperimente keine Beeinträchtigung zu erwarten ist.

Dennoch wurde der zusätzliche Reinigungsschritt über UNO-Q-Säulenchromatographie auf alle weiteren Enzympräparationen angewandt und alle anderen Untersuchungen (z.B. Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) mit so gereinigter 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (ohne nachweisbare Dehydrogenaseaktivität) durchgeführt.

3.4 Vergleich der Synthesen von γ -[2-²H₁]Butyrolacton über NMR Spektroskopie

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit der Syntheseprodukte müssen die Wasserstoffe des zu bestimmenden chiralen Zentrums in unterschiedlichen elektronischen Umgebungen fixiert werden. Zwei allgemeine Wege, chirale Zentren über NMR zu untersuchen, sind bekannt (Seco et al. 2004).

Im ersten Ansatz wird die Probe (z.B. ein reines Enantiomer) mit NMR in einer chiralen Umgebung untersucht. Diese wird durch chirale Lösungsmittel oder einem löslichen chiralen Agens in einem nicht chiralen Standard NMR-Lösungsmittel bereitgestellt (Weisman 1983). Der Vorteil dieses Verfahrens, dass keine kovalente Modifikation an der zu analysierenden Substanz erfolgen muss, ist zugleich dessen größter Nachteil. Denn eine chirale Umgebung verursacht im Vergleich zu einer kovalenten Modifikation nur sehr kleine Differenzen in der chemischen Verschiebung für zwei Enantiomere, deren NMR-Spektren sich ansonsten sehr ähnlich sind. Oftmals werden deswegen Messreihen mit beiden Enantiomeren benötigt und es lassen sich meist keine einfachen Zusammenhänge zwischen den NMR-Spektren und der absoluten Konfiguration der Enantiomere ableiten. Aus diesen Gründen ist der Nutzen der Methode auf die Bestimmung der Enantiomerenreinheit einer Probe beschränkt (Parker 1991; Finn 2002). Hierbei ist es notwendig, dass bei einem unbekannten Gemisch der beiden Enantiomere unterschiedliche NMR-Signale für jedes der beiden separat quantifizierbar sind.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration ist deutlich schwieriger, weil sie an einem einzelnen Enantiomer durchgeführt wird und normalerweise kein zweites Enantiomer zur Verfügung steht. Selbst wenn Vergleichsmöglichkeiten gegeben sind, müssen Kriterien entworfen werden, die absolute Konfiguration jedes Enantiomers separat zuzuordnen.

Deshalb wird im zweiten Ansatz das Syntheseprodukt (im Idealfall ein reines Enantiomer) mit zwei Enantiomeren eines chiralen Reagenz kovalent verknüpft und somit zwei diastereomere Derivate erzeugt (Rinaldi 1982; Yamaguchi 1983). Da in diesem Fall die chirale Umgebung von einem Hilfsreagenz durch eine kovalente Bindung an das Substrat zur Verfügung gestellt wird, ergeben sich größere Unterschiede in der chemischen Verschiebung, als mit der nicht kovalenten Methode. Auch eine Kombination der beiden ist möglich, indem z.B. Lanthanide als Shift Reagenz zu einem chiralen Derivat des Substrats zugegeben werden (Fraser 1983).

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration ist die Derivatisierung mit chiralen Hilfsreagenzien die Methode der Wahl (Seco et al. 2004).

3.4.1 Analyse der Enantiomerenreinheit von γ -Butyrolacton mit chiralen Amid

Die Stärke einer chiralen Verschiebung ist abhängig von der Art der Liganden am chiralen Zentrum und der Entfernung des zusätzlich eingebrachten chiralen Zentrums des Shift Reagenz. Hier ist das zusätzliche chirale Zentrum von dem zu testenden drei Atombindungen entfernt. Die Zielgruppe, d.h. die α -Protonen, ergeben normalerweise ein homogenes Triplet durch Kopplung mit den Protonen in β -Stellung. Durch Störung der Symmetrieachse des Moleküls werden diese von einander unterscheidbar. Abhängig davon, ob ein (*R*)- oder (*S*)-Amin für das Einbringen eines zweiten chiralen Zentrums genutzt wird, ist das Signal für die α -Protonen in der *R*- oder *S*-Position stärker verschoben. Es kann so die Größe der beiden Integrale bestimmt werden. Im Falle einer Deuteriummarkierung kann sowohl die Vollständigkeit als auch die Verteilung zwischen *R*- und *S*-Konfiguration durch Integration bestimmt werden. Eine Synthese mit unmarkiertem γ -Butyrolacton als Startmaterial (Reaktion in Abbildung 13 gezeigt) ermöglicht eine Einschätzung der Stärke der chiralen Verschiebung.

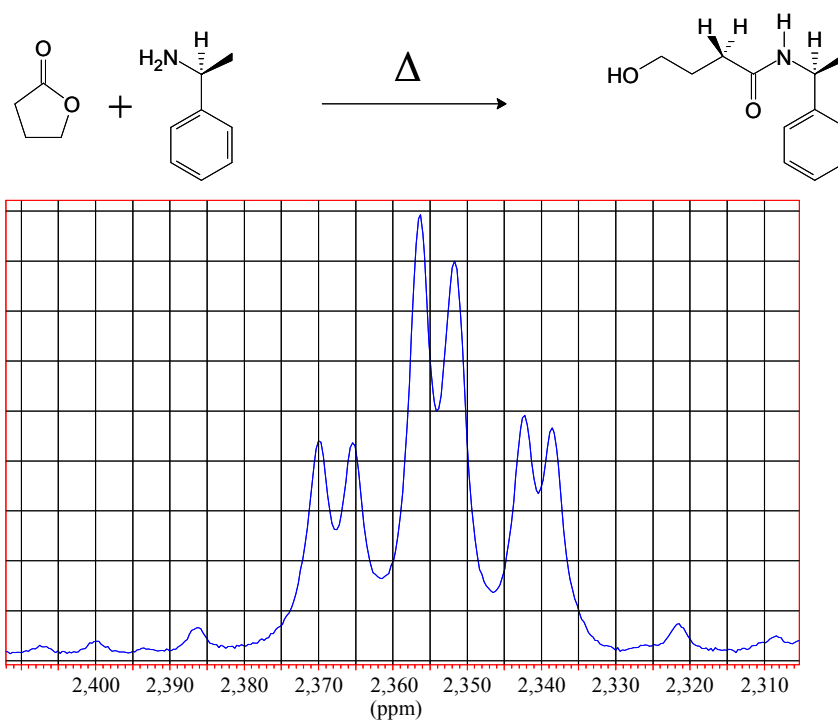


Abbildung 13. Derivatisierung von γ -Butyrolacton mit (*R*)-(+)- α -Methylbenzylamin. Die Ausschnittvergrößerung der Kopplung der α -Protonen (^1H -NMR (D₂O) δ 2.35, 2H, dt, J = 6,79, 2,19, CH₂CON) zeigt keine Basislinientrennung.

Die ^1H -NMR-Messung der Proben bei 300 MHz erbrachte nicht genügend Auflösung. Daher wurde bei 500 MHz eine besser aufgelöste Messung durchgeführt. Eine Detailansicht (Abbildung 13) der Kopplung der α -Protonen zeigt die erwartete Triplet-Kopplung ($J = 6,79$ Hz) bei einer Verschiebung von 2,35 ppm. Des Weiteren fällt auf, dass eine chirale Verschiebung von 2,19 Hz ein Duplet der Triplets erzeugt. Eine Abschätzung ohne Integration läßt auf eine Gleichverteilung schließen, wie sie bei unmarkiertem Material zu erwarten ist. Jedoch ist die chirale Verschiebung nicht groß genug, um eine Basislinientrennung zu erreichen. Daher wurden nach der Auswertung der Pilotsynthese keine weiteren Versuche mit markiertem Material unternommen.

3.4.2 Analyse der Enantiomerenreinheit von γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton mit Mosher-Säure-Estern

3.4.2.1 γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton ausgehend von 3-Benzoyloxypropan-1-ol synthetisiert

Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Analyse von 2-Benzoyloxyethanol verwendet und ergab dort eine deutliche Unterscheidung der Signale von *R*- und *S*-Konfiguration (Speranza et al. 2003). Gezeigt ist in Abbildung 14 schematisch die zu erwartenden Lage und Zuordnung der NMR-Signale der Protonen im Mosher-Ester mit 3-Benzoyloxypropan-1-ol ausgehend von den Daten mit 2-Benzoyloxyethan-1-ol.

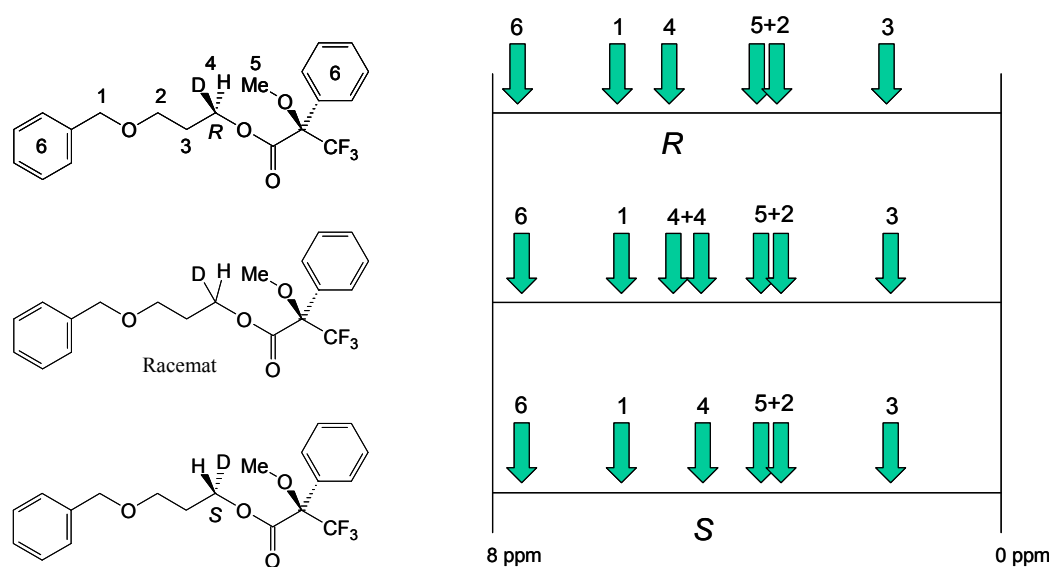


Abbildung 14. Theoretisch erwartete Verteilung der NMR-Signale von Mosher-Estern der verschiedenen Stereoisomere von 3-Benzoyloxy[1- $^2\text{H}_1$]propan-1-ol

Das tatsächliche ^1H -NMR-Spektrum des Mosher-Esters von (*R*)-3-Benzoyloxy[1- $^2\text{H}_1$]propan-1-ol (3-Benzoyloxy[1- $^2\text{H}_1$]prop-1-yl (2*R*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat) zeigt eine Überlagerung der Signale des zu analysierenden chiralen Alkohols mit der Benzoyloxy-Gruppe bei δ 4,45 ppm (1H+ 2H, m, $\text{CDHO} + \text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{O}$; Abbildung 15). Die Lage der Signale lässt eine Quantifizierung von Isomerenreinheit und absoluter Konfiguration nicht mit Sicherheit zu. Diese Methode wurde deswegen nicht weiter verwendet.

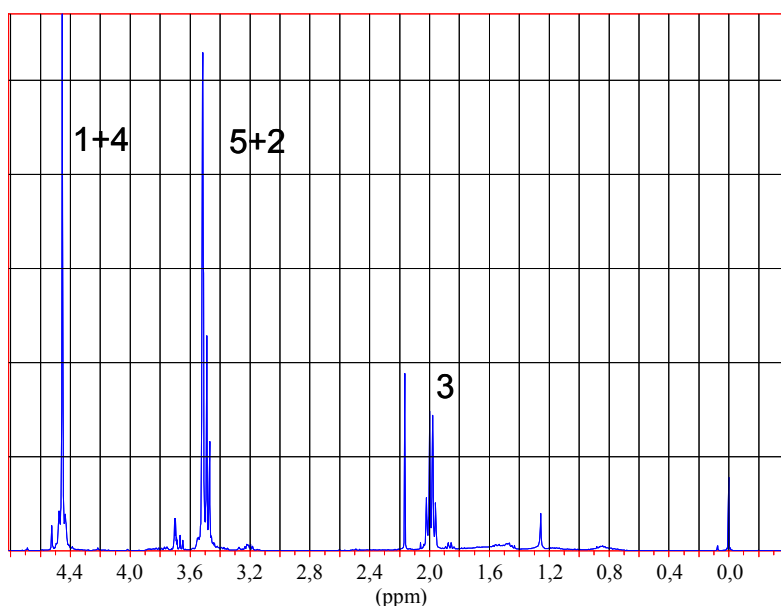


Abbildung 15. NMR-Spektrum von 3-Benzoyloxy[1- $^2\text{H}_1$]prop-1-yl (2*R*)-3,3,3-Trifluoro-2-methoxy-2-phenylpropanoat: Gezeigt ist die Überschneidung der Methoxy- und Propanether-Gruppen (δ 3,5; **5 + 2**) sowie des chiralen Alkohols mit der Benzoyloxy-Gruppe (δ 4,45; **1 + 4**). Die aliphatische CH_2 -Gruppe des Propylrestes (**3**) liegt bei δ 1,99 ppm.

3.4.2.2 4-Hydroxybutyrat

Eine NMR Charakterisierung des Produkts zeigte keine Bildung eines Esters der Mosher-Säure an. Es gelang unter den experimentellen Bedingungen nicht, die Ausgangsmaterialien in ausreichend trockenem Zustand für eine erfolgreiche Synthese zu erhalten. Da 4-Hydroxybutyrat selbst sehr hygroskopisch ist, wurde eine Reaktion mit γ -Butyrolacton versucht, die aber ebenfalls nicht zu auswertbaren NMR-Spektren führte.

3.4.3 Europiumliganden mit γ -Butyrolacton

Die Einführung eines zweiten chiralen Zentrums zur Abbildung der Wasserstoffatome der Markierung in unterschiedlichen Umgebungen kann auch über Koordination eines Liganden erfolgen. Ein chiraler Europium-Kampfer-Ligand (Europium tris[3-(heptafluoro-

propylhydroxymethylen)-(+)-camphorat]) wurde genutzt, um an den Carbonyl-Sauerstoff des Lactons zu binden (Abbildung 16 B). Dieser erlaubt, Signale für Wasserstoffe am selben Kohlenstoffatom aufzulösen, indem sie in *R*- oder *S*-Position zum Liganden stehen. Das Ausmaß der Verschiebung zwischen *R* und *S* sollte umso größer sein, je geringer die Distanz zum chiralen Zentrum ist.

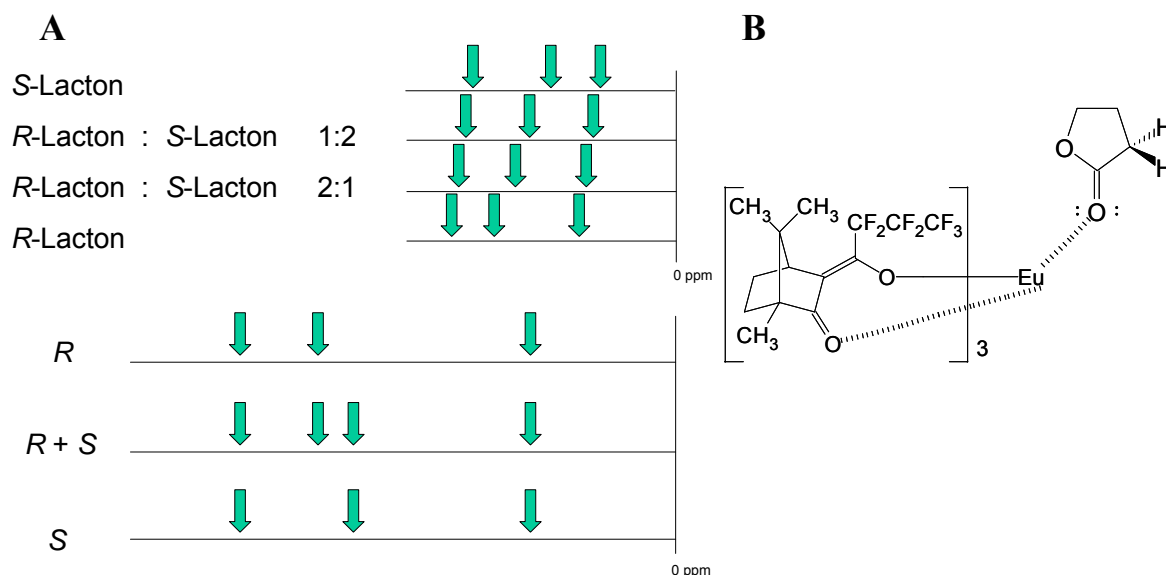


Abbildung 16 A. Schematische Darstellung der zu erwartenden (unten) und der tatsächlich gefundenen (oben) chiralen Verschiebungen durch den Europium-Liganden. B. Bindungsmodus des Europium-Kampferliganden an γ -Butyrolacton.

Das zu untersuchende chirale Zentrum liegt nur eine C-O und eine C-C Bindung entfernt. Die Aufspaltung der Signale sollte zwar auch am C-4 des Lactons zu bemerken sein, ist aber ohne eine Markierung dort ohne Relevanz. Der Effekt sollte für C-3 am geringsten sein, da die Wasserstoffe dort am weitesten vom Liganden entfernt liegen. Die Auswertung der Rohdaten ergab, dass bei zu geringen Ligandenkonzentrationen keine messbare Verschiebung auftrat. Liegt die Konzentration zu hoch, so überlagert das Signal des Europium-Kampfer-Liganden die Probe. Außerdem ist in immer stärkerem Maße eine Verbreiterung der Signale durch paramagnetische Resonanz des Europiums zu beobachten. Eine unterscheidbare Verschiebung wurde leider erst bei äquimolarem Mischverhältnis erzielt, bei dem die Kopplungsstrukturen innerhalb der Signale bereits zu verschmelzen begannen. Die Lage der Signale für γ -Butyrolacton ließ sich jedoch noch bestimmen ($^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)): **I**: δ 5,860 (dt, $J = 6,85$, $J = 1,51$, CH_2O); δ 5,326 (m, CHDCOO); δ 3,453 (m, CH_2); **II**: δ 5,728 (dt, $J = 6,87$, $J = 1,93$, CH_2O); δ 5,114 (m, CHDCOO); δ 3,343 (q, $J = 6,82$, CH_2); **III**: δ 5,568 (t, $J = 5,65$), δ 5,186 (m, CHDCOO); δ 4,815 (m, CHDCOO); δ 3,221 (q, $J = 6,82$, CH_2); **IV**: δ 5,385 (t, $J = 5,95$, CH_2O); δ 4,475 (m, CHDCOO); δ 3,067 (q, $J = 6,51$, CH_2)). Die Aufspaltung der Signale von

C-4 entspricht der erwarteten Triplet-Kopplung, die durch den Effekt des chiralen Shift Reagenz mit einer Duplet Komponente ($J = 1, 5 - 1,9$) erweitert wurde (d.h. 1 Signal / Proton). Teilweise ist die paramagnetisch verursachte Verbreiterung zu stark ausgeprägt, um die Kopplungskonstanten korrekt abzulesen. Für C-3 ließ sich nur die Quartett-Kopplung nachweisen, die für die Interaktion mit drei ($1 + 2$) Protonen normal ist. Eine differenzierte Aufspaltung wie etwa ein Dupplet (für 1 H am C-2) kombiniert mit einem Triplet (für 2 H am C-4) wurde aufgrund der Verbreiterung der Signale nicht beobachtet. Eine eventuelle, aufgrund der größeren Entfernung zum Europium-Kampfer-Liganden nicht sehr ausgeprägte, separate Darstellung der beiden Protonen am C-3 war nicht zu erreichen.

Unglücklicherweise wird jedoch das Signal für C-2 außerdem von einem breiten Signal des Kampfer-Liganden überlagert, das eine Integration unmöglich macht. Nur für das C-2-Signal wurde eine Lageänderung erwartet, abhängig davon, ob das Lacton in *S*- oder *R*-Konfiguration vorliegt, während die unmarkierten Positionen C-3 und C-4 keine Veränderung zeigen sollten. Bei Änderung des Verhältnisses von *R* zu *S* wurde jedoch eine Verschiebung von C-3 und C-4 gefunden. Die schematische Darstellung verdeutlicht den Unterschied zwischen dem erwarteten Auftreten neuer Signale für das jeweils andere Stereoisomer und der gefundenen Verschiebung der gesamten Signalgruppe (Abbildung 16 A). Die Überlagerung der Signale für C-2 macht eine Lokalisierung des zweiten Isomers bei gemischten Proben (**II**, **III**, Bereich 4,5 bis 5,5 ppm, Abbildung 17) schwierig. In Probe **II** (Verhältnis 66 % *S* 33 % *R*) wird aufgrund einer auftretenden Spitze des breiten Signals die Lage eines der beiden Isomerenpeaks auf ca. 5,1 ppm geschätzt, während der Andere von diesem vollkommen verborgen wird. Probe **III** (33 % *S*, 66 % *R*) zeigt ein Signal als Schulter bei 5,2 ppm und ein weiteres, deutlicher getrennt bei 4,8 ppm. Die Proben **I** (100 % *S*) und **IV** (100 % *R*) zeigen Signale bei 5,33 und 4,47 ppm. Die unerwartete Verschiebung für C-3 (**I** δ 3,45, **II** δ 3,34, **III** δ 3,22, **IV** δ 3,07) von insgesamt 0,38 ppm und C-4 (**I** δ 5,86, **II** δ 5,73, **III** δ 5,57, **IV** δ 5,39) von insgesamt 0,47 ppm ist schematisch in Abbildung 16 dargestellt und in Abbildung 17 mit Pfeilen markiert. Die Verschiebung ist linear zu der Änderung des Mischverhältnisses der Isomere. Diese Phänomene erlauben keine Aussage über Isomerenreinheit und ermöglichen nur eine unsichere Zuordnung der Signale für C-2. Subtrahiert man die gesamte Verschiebung (gemittelt über C-3 und C-4 = 0,425 ppm) von der Differenz des C-2-Signals (**I** gegen **IV** = 0,86 ppm) der isomerenreinen Proben, erhält man die durch den Liganden erzeugte Verschiebung (0,435 ppm). Dies korreliert mit den getrennt auftretenden Signalen in Probe **III**, die 0,4 ppm voneinander entfernt sind. Insgesamt betrachtet tritt für C-3 und C-4 eine

Verschiebung auf, die abhängig vom Verhältnis der beiden Isomere ist. Dieses Phänomen ist ohne Schiftreagenz nicht zu beobachten. Für das ^1H -Signal der Protonen am C-2 kann ein stärkerer Unterschied zwischen *R*- und *S*-Isomer festgestellt werden, jedoch ist eine Quantifizierung der Isomerenreinheit nicht möglich.

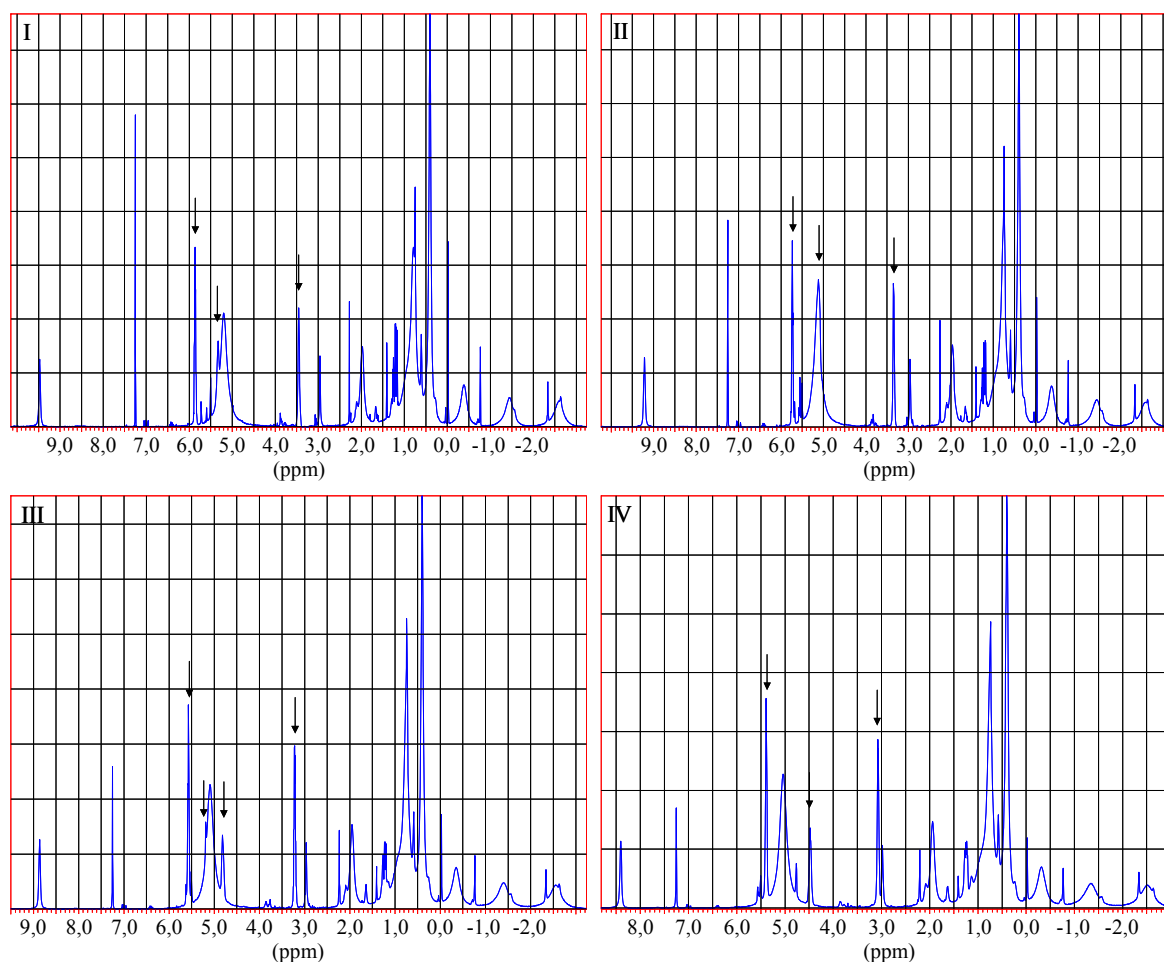


Abbildung 17. NMR-Spektren der Lactongemische (synthetisiert aus Methionin) in äquimolarem Verhältnis zum Europium-Kampfer-Liganden ($70\ \mu\text{mol}$ / Probe): **I.** 100 % (*S*)-Lacton; **II.** 66 % (*S*)- und 33 % (*R*)-Lacton; **III.** 33 % *S*- und 66 % (*R*)-Lacton; **IV.** 100 % (*R*)-Lacton. Die markierten Signale entsprechen γ -Butyrolacton.

Um dem Problem der Überlagerung von Signalen zu begegnen, wurden die Proben in *nicht* deuteriertes Lösungsmittel überführt und mit ^2H -NMR gemessen. Die daraus folgenden Spektren (Abbildung 18) zeigen nur noch Spuren von Chloroform (CDCl_3 ; **I.** δ 7,507; **II.** δ 7,392; **III.** δ 7,554; **IV.** δ 7,495) sowie die Deuteriummarkierung (**I.** δ 3,147; **II.** δ 3,091; **III.** δ 5,224; **IV.** δ 5,356). Als interner Standard dient die Lage des Chloroformsignals. Hierbei fällt auf, dass bei einer Mischung der Isomere (Abbildung 18, **II** und **III**) kein getrenntes Signal für *R* oder *S* zu erkennen ist. Die Proben mit reinem oder überwiegend (*S*)-Lacton (Abbildung 18, **I** und **II**) erzeugen ein Signal bei ca. 3,1 ppm. Die Proben mit reinem oder

überwiegend (*R*)-Lacton (Abbildung 18, **III** und **IV**) erzeugen ein Signal bei ca. 5,3 ppm. Dies stellt ein interessantes Messartefakt im ^2H -NMR dar, bei dem nur für das in der jeweiligen Probe in der höchsten Konzentration vorhandene Isomer ein Signal gemessen werden konnte. Das Konzentrationsverhältnis von Lacton zu Shift Reagenz könnte dabei eine Verschiebung der Relaxationszeiten bewirken, so dass das Signal des in der niedrigeren Konzentration vorliegenden Isomers außerhalb des Zeitfensters der Messung läge. Eine Messreihe mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen könnte darüber Aufschluss geben (Xiulan Xie; Philipps-Universität-Marburg, Fachbereich Chemie, persönliche Mitteilung). Somit kann auch dieses Verfahren nicht genutzt werden, um den Anteil von Stereoisomeren in Gemischen zu bestimmen.

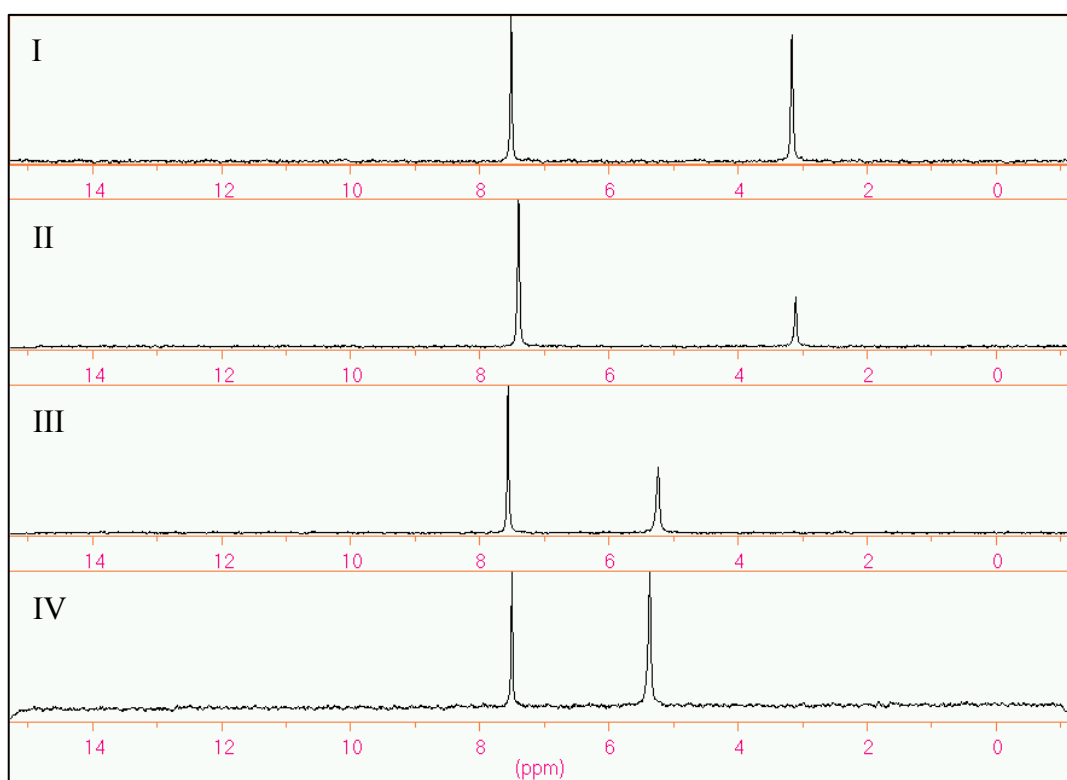


Abbildung 18. ^2H -NMR-Spektren (CHCl_3) der Lactongemische (synthetisiert aus Methionin) in äquimolarem Verhältnis zum Europium-Kampfer-Liganden ($70\ \mu\text{mol}$ / Probe): **I.** 100 % (*S*)-Lacton, δ 7,507 (s, CDCl_3), δ 3,147 (s, CDHCOO); **II.** 66 % *S*- und 33 % (*R*)-Lacton, δ 7,392 (s, CDCl_3), δ 3,091 (s, CDHCOO); **III.** 33 % (*S*)- und 66 % (*R*)-Lacton, δ 7,554 (s, CDCl_3), δ 5,224 (s, CDHCOO); **IV.** 100 % (*R*)-Lacton, δ 7,495 (s, CDCl_3), δ 5,356 (s, CDHCOO).

3.5 CD-Spektroskopie – Enantiomerenreinheit und absolute Konfiguration der γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolactone

Für die Analyse der absoluten Konfiguration der aus Methionin bzw. aus 3-Benzoyloxypropan-1-ol hergestellten γ -[2- $^2\text{H}_1$]Butyrolactone wurden diese zunächst hydrolysiert (äquimolar Mengen NaOH) und zu (*S*)- bzw. (*R*)-[2- $^2\text{H}_1$]Bernsteinsäure oxidiert (Natriumchlorit, Natriumhypochlorit und TEMPO). Die bekannte Elipitizität von Bernsteinsäure diene als Referenz (Listowsky et al. 1970), um die enantiomere Reinheit und absolute Konfiguration der beiden Synthesen anhand der molaren Elipitizitäten zu bestimmen.

Für die statistische Auswertung von 20 Spektren pro Probe (Abbildung 19) bei einem Konfidenzintervall mit 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit wurde die molare Elliptizität bei 206 nm ($[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}}$) und 24 °C für einen Vergleich mit der Literatur (**2 S**: $\Theta = + 4,13$ umgerechnet für 4 mg / ml, $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}} = + 122,9$; **2 R**: $\Theta = - 4,98$ umgerechnet für 4 mg /ml, $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}} = - 148,2$) (Hartrampf und Buckel 1986) bzw. bei 208 nm $[\Theta]_{208,24\text{ }^\circ\text{C}} = + 150$ (D-(+)-[2- $^2\text{H}_1$]Bernsteinsäure, Registernummer 10013-03-3) (Listowsky et al. 1970) gewählt. Der Wägefehler betrug $\pm 0,1$ mg (5 %) und wurde im Folgenden in die Konfidenzintervalle eingerechnet.

Für die Umrechnung von Θ in $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}}$ wurde folgende Formel benutzt:

$$[\Theta]_{\lambda,T} = m^\circ \times m \times (10 \times c \times d)^{-1}$$

λ = Wellenlänge des eingestrahnten Lichts in nm
 T = Messtemperatur in °C
 m° = gemessener Winkel in milligrad (Θ)
 m = Molekulare Masse
 c = Konzentration in mg / ml
 d = Schichtdicke in cm

[2- $^2\text{H}_1$]Succinat hergestellt aus 3-Benzoyloxypropan-1-ol ergab für Θ und $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}}$ je nach Herstellungsmethode folgende Werte: *R*-ALPINE-BORANETM $\Theta = - 3,98 \pm 0,37$, $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}} = 118,4 \pm 11,0$, *S*-ALPINE-BORANETM $\Theta = + 4,49 \pm 0,44$, $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}} = 133,6 \pm 13,1$ (Abbildung 19, Tabelle 2). Das Vorzeichen der Elliptizität bestätigt die angenommene Stereokonfiguration von 2*R* für eine Synthese mit *R*-ALPINE-BORANETM und 2*S* für *S*-ALPINE-BORANETM. Da aufgrund bisheriger Untersuchungen eine nahezu vollständige (NMR, > 95 % Deuteriummarkierung, Abschnitt 3.1.1) und isomerenreine (MALDI-TOF-MS

> 90 % Deuteriummarkierung, keine Racemisierung nachweisbar, Abschnitt 3.1.1) Synthese mit ALPINE-BORANETM angenommen werden kann, werden die CD-Messungen dieser Synthese zum Vergleich für die Isomerenreinheit der von Methionin ausgehenden Synthese genutzt. Diese hat ebenfalls eine nahezu vollständige Markierung mit Deuterium (NMR, > 98 %, Abschnitt 3.1.2), zeigte aber Anteile des jeweils anderen Stereoisomers (MALDI-TOF-MS, 10 – 20 %, Abschnitt 3.1.2). Da das jeweils andere Stereoisomer durch entgegengesetzte Drehung eine Verringerung des Betrags (doppelt äquivalent) der gemessenen Elliptizität bewirkt, muss sein Anteil aus der halben Differenz zu der mit 100 % Enantiomerenreinheit (90 % vollständige Deuteriummarkierung) angenommenen Synthese bestimmt werden.

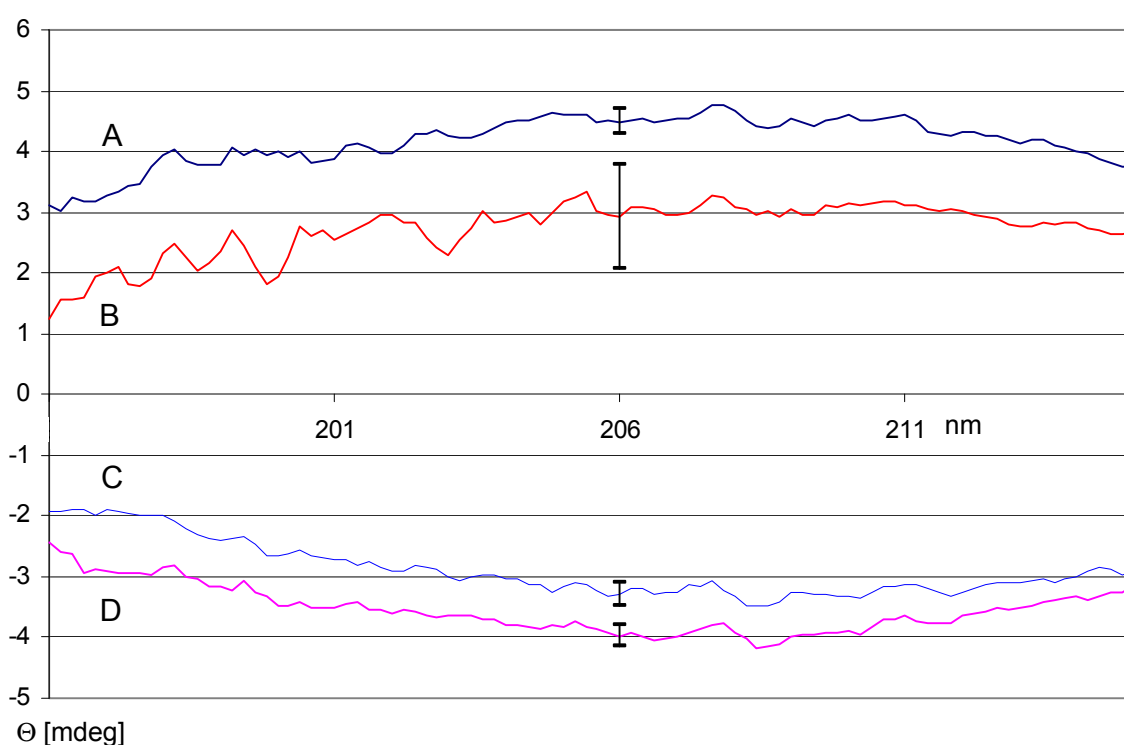


Abbildung 19. CD-Spektren von $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Succinat}$ (206 nm, 24 °C, 196 nm bis 216 nm, 4 mg/ml, pH 2,5) ausgehend von: (A) 3-Benzoyloxypropan-1-ol mit *S*-ALPINE-BORANETM, (D) *R*-ALPINE-BORANETM, (B) D-Methionin und (C) L-Methionin. Mittelwerte über 20 Spektren mit Fehlerabschätzung: Die Konfidenzintervalle werden mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5 % angegeben.

Für die Synthese ausgehend von (*R*)-Methionin wurde $\Theta_{206} = +2,92 \pm 1,00$ bzw. $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}} = 86,9 \pm 29,6$ und für (*S*)-Methionin $\Theta_{206} = -3,28 \pm 0,36$ bzw. $[\Theta]_{206,24\text{ }^\circ\text{C}} = 97,6 \pm 10,7$ bestimmt (Abbildung 19, Tabelle 2). Dies deutet für (*R*)-Methionin auf ein Gemisch von (*R*)- (82,5 %) und (*S*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Succinat}$ (17,5 %) und für (*S*)-Methionin von (*S*)- (91,3 %) und (*R*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]\text{Succinat}$ (8,7 %) hin (Tabelle 2).

Tabelle 2. CD-Spektroskopie der Syntheseprodukte. Die Enantiomerenreinheit der Synthesen über Methionin ist im Vergleich zu denen über ALPINE-BORANETM dargestellt.

Ursprung des Succinats	Konzentration	$\Theta_{206} /$ $[\Theta]_{206,24\text{ }^{\circ}\text{C}}$	Enantiomeren Reinheit	Succinat Konfiguration
	[mg / ml]	[mdeg. / cm]	[Ø in %]	
3-Benzylxypropan-1-ol (<i>S</i> -ALPINE-BORANE)	4,0	+ 4,5 ± 0,4/ + 134 ± 13	100	2 <i>S</i>
3-Benzylxypropan-1-ol (<i>R</i> -ALPINE-BORANE)	4,0	– 4,0 ± 0,4/ – 118 ± 11	100	2 <i>R</i>
D-Methionin	4,0	+2,9 ± 1,0/ + 87 ± 30	83	2 <i>S</i>
L-Methionin	4,0	– 3,3 ± 0,2/ – 98 ± 11	91	2 <i>R</i>

3.6 Stereoselektive Bildung der chiralen Methylgruppe von Crotonyl-CoA

Zur Klärung der Stereokonfiguration einer frei drehbaren Gruppe mit drei identischen Liganden müssen alle drei durch Isotopenmarkierung voneinander unterscheidbar gemacht werden. Ist die Konfiguration der Markierungen vor und nach der Katalyse bekannt, kann durch die Position der verbliebenen Liganden, relativ zu dem ausgetauschten, die Stereospezifität der Reaktion bestimmt werden. Eine Inversion würde zu einem relativen Positionswechsel und eine Retention zu unveränderter Stellung der verbliebenen Liganden relativ zu dem Austauschenden führen.

Hier wurde das Verfahren zur Analyse von chiralen Methylgruppen über Essigsäure nach (Cornforth et al. 1969) und (Lüthy et al. 1969) modifiziert für die experimentelle Durchführung nach (Pierik et al. 2002) angewandt. Das zu analysierende Substrat muss an dem Kohlenstoffatom, an dem durch Substitution die fragliche Methylgruppe entsteht, eine vollständige stereospezifische Deuteriummarkierung und eine detektierbare stereospezifische Tritiummarkierung tragen.

(*R*)- und (*S*)- γ -[4-³H, 4-²H₁]Butyrolactone wurden hydrolysiert und auf CoA-Ester transferiert. Nach der Substitution der Hydroxylgruppe durch die Dehydratase entsteht die zu analysierende Methylgruppe im Crotonyl-CoA. Dieses wird nun in zwei Moleküle Essigsäure umgewandelt, von denen eins die fragliche Methylgruppe trägt (Abbildung 20 A).

Die chirale Essigsäure wird nun auf Coenzym A übertragen und mit Glyoxylat und Malatsynthase unter Inversion zu (*S*)-Malat kondensiert (Abbildung 20 B). Diese Reaktion bezüglich C3 des Malats ist nicht per se stereoselektiv, sondern wird über den intramolekularen Isotopeneffekt von $k = k^1\text{H} / k^2\text{H} = 4$ in der Methyl-Gruppe des Acetyl-CoAs für Malatsynthase gesteuert, d.h. die Malatsynthase wird ein Proton bevorzugt eliminieren und im Fall von (*S*)-Acetat (2*S*, 3*R*)-[3-²H₁, ³H]Malat und (2*S*, 3*S*)-[3-³H]Malat im Verhältniss 4 zu 1 liefern. Außerdem entsteht noch etwas (2*S*, 3*R*)-[3-²H₁]Malat, das aber nicht radioaktiv ist und daher bei der weiteren Analyse nicht erfasst wird. Fumarase eliminiert bei der Bildung von Fumarat stereoselektiv das *Re*-Proton *anti* zur (*S*)-Hydroxylgruppe und kann deswegen als Indikator für die Stellung der Tritiummarkierung genutzt werden.

Somit verliert (2*S*,3*R*)-[3-²H₁, ³H]Malat das Tritium vollständig, während es im (2*S*,3*S*)-[3-²H₁, ³H]Malat erhalten bleibt. Aus (*S*)-Acetat entsteht also Malat, das bei Fumarase-Behandlung maximal 80 % des Tritiums mit dem Wasser austauscht, während Malat aus (*R*)-Acetat dagegen maximal 80 % des Tritiums behält (Abbildung 20 B). Racemisches oder [³H]Acetat ergeben Malate, die nach Equilibrierung mit Fumarase noch 50 % Tritium enthalten bzw. verlieren.

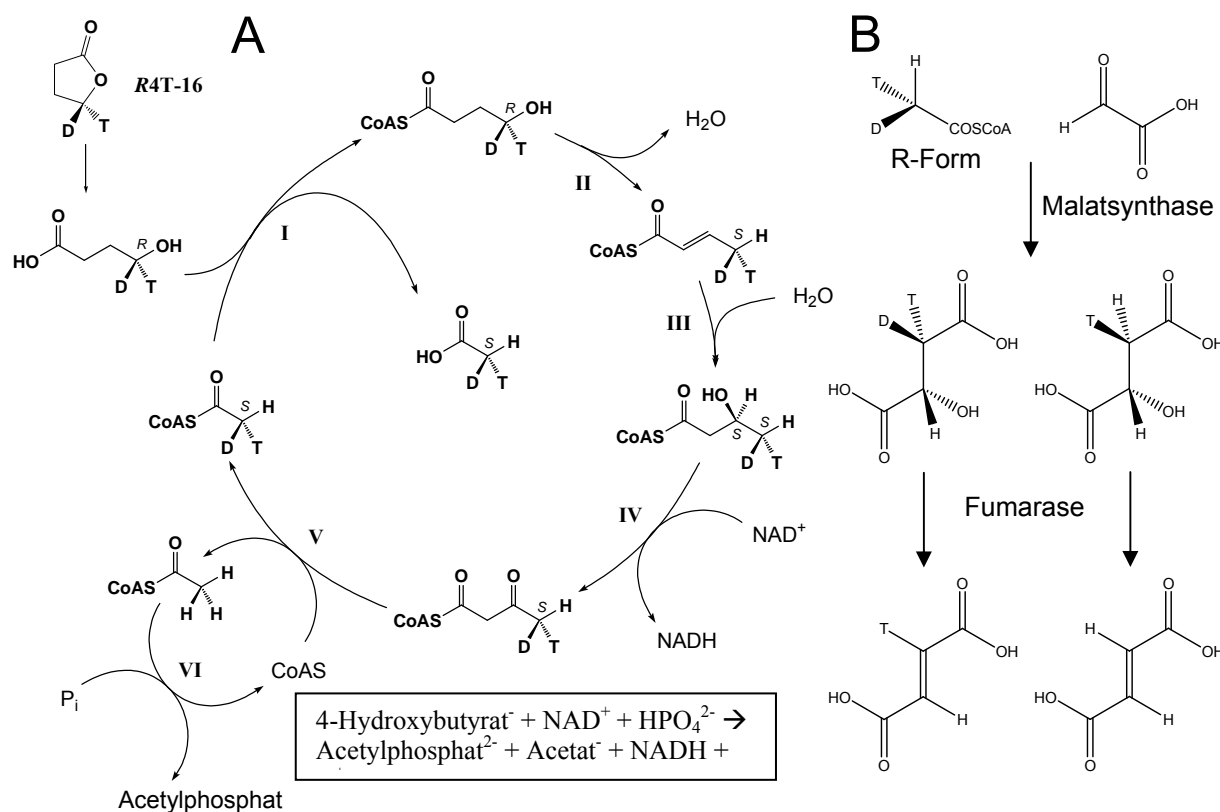


Abbildung 20 A. Eintopf Umwandlung von (*R*)-4-Hydroxy[4-²H₁, ³H]butyrat zu (*S*)-[²H₁, ³H]Essigsäure: 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase (I), 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (II), Crotonase (III), (*S*)-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase (IV), Thiolase (V), und Phosphotransacetylase (VI) **B.** Analyse via Malatsynthase und Fumarase

3.6.1 Synthese der am C4 markierten 4-Hydroxybutyrat

Für die Synthese von (*R*)-γ-[4-³H, 4-²H₁]Butyrolacton wurde ein bereits vorhandener sicherer Weg genutzt (Wermuth 1979; Näser 2004), eine möglichst vollständige Markierung mit Deuterium am C4 von Succinatsemialdehyd zu erhalten. Dieses wurde dann enzymatisch mit NAD³H zu 4-Hydroxy[4-²H₁, ³H]butyrat reduziert. Für die Synthese von (*S*)-γ-[4-³H, 4-

$^2\text{H}_1$]Butyrolacton wurde nach einem ähnlichen Verfahren Tritium in Succinatsemialdehyd über Ethyl[^3H]formiat eingebaut.

Bei der Synthese von deuteriertem γ -Ethoxybutyrolacton fiel auf, dass mit der vorliegenden Methode keine vollständige (im Rahmen der Reinheit des verfügbaren [^2H]Ethylformiats) Markierung zu erreichen war. Da die komplette Synthese bis auf einen Schritt in organischer Umgebung durchgeführt wurde, wird angenommen, dass nach der Entschützung des Diethyl[$^2\text{H}_1$]formylsuccinats (**24a**) zur Dicarbonsäure die Säureprotonen beim Ringschluss zu γ -Ethoxy[4- ^2H]butyrolacton (**25a**) teilweise mit der Markierung am C4 austauschen (Abbildung 43).

Dieses Problem wurde untersucht, indem der Reinigungsschritt in der Synthese des Endprodukts direkt vor der letzten Destillation in D_2O durchgeführt wurde. Wird nun unmarkiertes Diethylformylsuccinat als Ausgangsmaterial benutzt, kann beim Ringschluss (nach Decarboxylierung und Ethanoleliminierung) eine eventuelle Übertragung der Protonen der freien Säuregruppe erfolgen. Die Analyse der Endprodukte mit ^1H -NMR und ^2H -NMR zeigt eine Markierung in C2, C3 und C4. Dies zeigt, dass ein Austausch auch an der für die weitere Untersuchung der Stereoselektivität der Dehydratase wichtigen C4 Position stattfindet. Dieser Effekt kann durch die Verwendung von D_2O bei der Synthese von markiertem γ -Ethoxy[4- ^2H]butyrolacton zur Erhöhung des Deuteriumgehalts an C4 genutzt werden. Die dabei auftretenden weiteren Deuteriummarkierungen an C2 und C3 haben auf die Analyse der Chiralität der Methylgruppe im späteren Versuchsverlauf keinen Einfluss.

Das Verhältnis der Integrale des ^1H -NMR-Spektrums (C4 0,17; C3 1,16; C2 2,00) und die komplexen Kopplungen der Signale zeigen die Gegenwart von Deuterium an jeder der Positionen an (Abbildung 21, grünes Spektrum). Eine Messung mit ^2H -NMR konnte dies bestätigen. Hierbei beträgt das Verhältnis der Integrale 1,0 (C4) zu 0,9 (C3) zu 1,19 (C2) (Abbildung 21, schwarzes Spektrum). Die Inkorporation von Deuterium nach dem Austausch der Protonen der freien Säuregruppen weist auf einen Austausch während der Decarboxylierung und dem Ringschluss an C3 und C4 hin. Der Einbau von Deuterium an C2 Position ist durch die Azidizität des in α -Position zu einer Carboxylgruppe gelegenen Wasserstoffs erklärbar. Der so mit Deuterium markierte und in situ hergestellte Succinatsemialdehyd wurde weiter für die zweite Markierung verwendet, welche enzymatisch erfolgte.

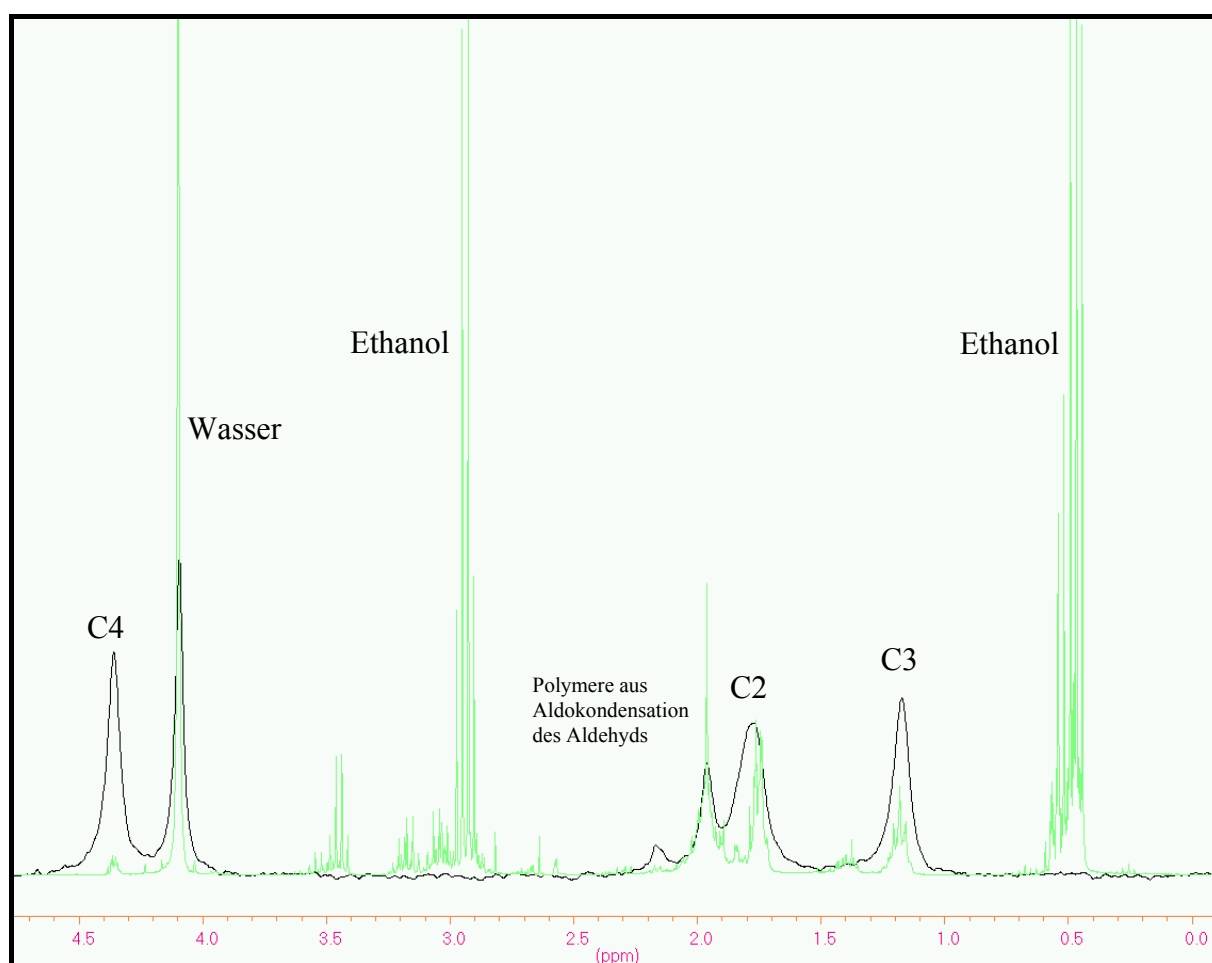


Abbildung 21. ^1H - (grün) und ^2H -NMR-Spektren (schwarz) von Succinatsemialdehyd zeigen Deuteriuminkorporierung für C4, C2 und C3. ^1H -NMR δ 4,92 (0, 17 H, m, COD(H)) 2,30 (2,00 H, m, CH_2COOH) 1,73 (1,16 H, m, CH_2COD) ^2H -NMR δ 4,36 (1 D, s, COD(H)) δ 1,78 (1,19 D, s, $\text{CH}(\text{D})_2\text{COOH}$) δ 1,17 (0,90 D, s, $\text{CH}_2(\text{D})\text{COD}$)

Die Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Pferdeleber katalysiert stereospezifisch die Übertragung eines Wasserstoffs auf die *Re*-Seite einer Aldehydgruppe (Adolph et al. 1991; Adolph et al. 1993). Es ist also möglich aufgrund der weiten Substratspezifität der ADH aus 4-Oxo[4- $^2\text{H}_1$]butyrat (*R*)-4-Hydroxy[4- ^3H , $^2\text{H}_1$]butyrat sowie aus 4-Oxo[4- ^3H]butyrat (*S*)-4-Hydroxy[4- ^3H , $^2\text{H}_1$]butyrat herzustellen (Abschnitt 2.21.2, Material und Methoden). Die Reaktion ist auf eine stetige Regeneration von NADD bzw. NADH(T) durch Formiatdehydrogenase (FDH) angewiesen. Hierbei erwies sich jedoch der durch die Herstellung von 4-Oxobutyrat (Succinatsemialdehyd) bedingte Anteil von Ethanol im Reaktionsgemisch als Problem, denn die Reaktion der ADH mit Ethanol und gebildetem NAD^+ steht in Konkurrenz zu der Reaktion der FDH und kann Wasserstoff aus Ethanol in den Kreislauf der Reaktion einführen. Um Produkte mit möglichst vollständiger Markierung zu erhalten, wurde der Anteil an Ethanol durch mehrmalige Volumenreduktion verringert und

FDH im Überschuss zugegeben. Dieses Problem ergab sich nicht bei der Synthese mit 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (4-HBDH), die zu Produkten mit 50 prozentigem Deuteriumgehalt am C4 (^1H NMR (CDCl_3) δ 4,34 (1H, tt, $J = 7,05, 1,35$, CDHO) ^{13}C NMR (CDCl_3) δ 67,16 (t, $J = 23,12$, CDHO)) bzw. höherer spezifischer Aktivität (bei Tritiummarkierung; Tabelle 3) führte. Eine massenspektrometrische Charakterisierung der Deuteriummarkierung wurde auf der Ebene der CoA-Ester durchgeführt (Abbildung 22).

Tabelle 3. Spezifische Aktivitäten der Syntheseprodukte im Verlauf des Experiments zur Analyse der chiralen Methylgruppe.

Butyrolacton	Enzyme zur Substrat-herstellung	spezifische Aktivitäten [$\mu\text{Ci} / \text{mmol}$]		
		Lacton	Acetat	Malat (vor Fumarase)
(<i>R</i>)- γ -[4- ^3H ,4- $^2\text{H}_1$]	4-HBDH	116	42	17,8
(<i>R</i>)- γ -[4- ^3H ,4- $^2\text{H}_1$]	ADH	53	11,1	nicht bestimmt
(<i>S</i>)- γ -[4- ^3H ,4- $^2\text{H}_1$]	4-HBDH	2,0	1,1	0,9
(<i>S</i>)- γ -[4- ^3H ,4- $^2\text{H}_1$]	ADH	1,1	0,5	nicht bestimmt

Die relativ geringe spezifische Aktivität bei der Synthese des *S*-Isomers lässt sich durch Verluste bei der Synthese (Destillation von Ethyl[^3H]formiat) und eine möglichst geringe Menge an eingesetztem Tritium (Gefahr von gasförmiger Radioaktivität) erklären.

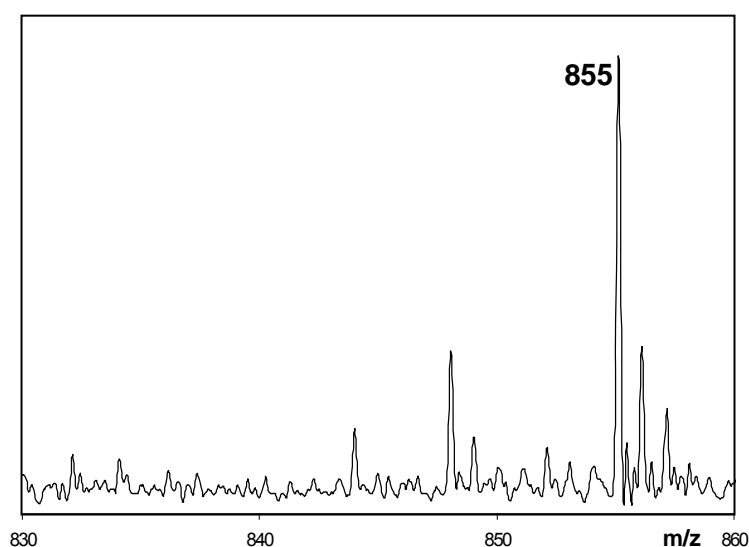


Abbildung 22. MALDI-TOF-MS zeigt (*R*)-4-Hydroxy[4- $^2\text{H}_1$]butyryl-CoA ($m/z = 855$ Da) ohne Doppelmarkierung (Erhöhte Intensität bei 856 Da) oder unmarkierte Anteile (854 Da). Es findet kein durch ADH oder 4-HBDH katalysierter Austausch mit Wasser statt.

Da die Stereospezifität von 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (4-HBDH) noch nicht bekannt war, wurde diese ermittelt, indem alle folgenden Resultate mit denen durch Alkoholdehydrogenase (ADH) erworbenen verglichen wurden. Die Substrate, welche mit 4-HBDH hergestellt worden waren, lieferten mit denen durch ADH erzeugten vergleichbare Ergebnisse lieferten. Die 4-HBDH überträgt also ebenfalls Wasserstoff auf die *Re*-Seite der Aldehydgruppe und hat damit dieselbe Stereoselektivität wie ADH (Adolph et al. 1991; Adolph et al. 1993).

3.6.2 Konfiguration der chiralen Methylgruppe von Crotonyl CoA nach der Reaktion der Dehydratase mit (*R*)- und (*S*)-4-Hydroxy[4-³H, ²H₁]butyrat

Der Umsatz von 4-Hydroxybutyryl-CoA durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase erfordert zur Bildung der Methylgruppe von Crotonyl-CoA den Ersatz der Hydroxylgruppe gegen Wasserstoff. Werden am C4 zweifach mit Deuterium und Tritium markierte Substrate verwendet, so entsteht dabei eine chirale Methylgruppe. Das Substrat wird danach für eine Analyse der Konfiguration der Methylgruppe in einer Eintopf-Reaktion (Abbildung 20 A) zunächst in Acetat umgewandelt.

Für den Einsatz als Substrat wurden zunächst die synthetisierten Lactone zu den Carboxylaten hydrolysiert und enzymatisch durch die 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase zu (*R*)-4-Hydroxy[4-³H,4-²H₁]butyryl-CoA beziehungsweise (*S*)-4-Hydroxy[4-³H,4-²H₁]butyryl-CoA umgewandelt. Die Reaktion mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ergibt nun Crotonyl-CoA, welches die chirale Methylgruppe enthält.

Crotonase hydratisiert dieses zu (*S*)-3-Hydroxybutyryl-CoA, das nun durch die (*S*)-3-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydrogenase zu Acetoacetyl-CoA dehydriert wird, welches mit CoSH unter Thiolase-Katalyse zu zwei Molekülen Acetyl-CoA gespalten werden kann. Ein Acetyl-CoA lieferte beim CoA-Transfer zu 4-Hydroxybutyryl-CoA Acetat, während Acetylphosphat aus dem zweiten Acetyl-CoA durch Phosphorolyse unter Regeneration von freiem Coenzym A entstand (Abbildung 20 A). Die Reaktion wurde durch Ansäuern auf pH 1 für den nächsten Schritt abgestoppt. Die freie und die durch saure Hydrolyse von Acetylphosphat gebildete Essigsäure wurden nun zusammen durch Wasserdampfdestillation isoliert.

Bei Retention der Konfiguration (bezogen auf die eliminierte Hydroxylgruppe) wird (*R*)- γ -[4- $^2\text{H}_1$, ^3H]Butyrolacton zu (*R*)-Acetat und dieses mit Glyoxylat weiter zu [3- ^3H]Malat (Malatsynthase) umgesetzt. Das isolierte Malat verliert bei Inkubation mit Fumarase mindestens 20 % der spezifischen ^3H -Aktivität. Eine weitergehende Verminderung deutet auf eine nicht vollständige ^2H -Markierung des Lactons oder auf eine Racemisierung hin. Inversion der Konfiguration würde die Bildung von einen [3- ^3H]Malat bedeuten, das bei Umsatz mit Fumarase bis zu 80 % der ^3H -Markierung verliert. Nur mit Tritium markiertes Acetyl-CoA bildet bei Reaktion mit Malatsynthase ein im Bezug auf die Konfiguration der Tritiummarkierung stereounspezifisches [3- ^3H]Malat. Bei einer unvollständigen Deuteriummarkierung von z.B. 50 % würde 50 % stereounspezifisch mit Tritium markiertes Malat entstehen. Somit würde eine Verschiebung der theoretischen Grenzen auf 65 % zu 35 % erfolgen.

Die Zusammenfassung der Resultate des chiralen Methylgruppenexperiments zeigt für die spezifischen Aktivitäten im Verlauf des Experiments eine Verringerung beim Umsatz der Lactone zu Acetat (Tabelle 3). Pro Mol γ -Butyrolacton werden hier 2 Mol Acetat gebildet, woraus sich eine 50 % Verringerung der spezifischen Aktivität ergeben müsste. Die erwartete Abnahme wurde ausgehend von (*S*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton gefunden, jedoch zeigte sich für (*R*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton ein zusätzlicher Verlust in den vorherigen Schritten (Tabelle 3). Dies kann durch die Verwendung von [^3H]Formiat beim Umsatz von 4-Oxo[4- ^2H]butyrat zu (*R*)- γ -[4- ^3H , 4- $^2\text{H}_1$]Butyrolacton erklärt werden, wodurch zusätzliches Tritium in die folgenden Reaktionsschritte verschleppt wurde. Die Ameisensäure geht über die nun folgenden Reinigungsschritte (Dampfdestillation und DOWEX-Säule) graduell verloren und bewirkt so einen Verlust an Tritium aus dem Reaktionsgemisch und somit scheinbar eine stärkere Verringerung der spezifischen Aktivität des Acetats. Für das *S*-Isomer waren die beobachteten spezifischen Aktivitäten wie erwartet und blieben auch im Malat konstant.

Eine weitere Reduzierung der spezifischen Aktivität kann nur noch bei der Entfernung von Tritium durch die Malatsynthase bei der Kondensation des markierten Acetyl-CoAs mit Glyoxylat stattfinden. Diese Abnahme macht jedoch durch den starken Isotopeneffekt von Tritium bedingt nur ca. 10 % aus und wurde in vergangenen Arbeiten bereits beschrieben (Cornforth et al. 1969; Pierik et al. 2002).

Die Analyse des Malats mit Fumarase ergab für (*R*)-[4-²H₁, ³H]Butyrolacton als Substratvorstufe einen Verlust von 29 % (4-HBDH) bzw. 30 % (ADH) der Markierung und für (*S*)-[4-²H₁, ³H]Butyrolacton einen Verlust von 59 % (Tabelle 4). Somit geschieht der Austausch der Hydroxylgruppe mit einem Wasserstoff durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase unter Retention der Konfiguration.

Tabelle 4. Ergebnisse der Flüssigszintillationsmessungen von Malat vor und nach Inkubation mit Fumarase: Ausgehend von (*R*)-[4-²H₁, ³H]Butyrolacton wird die Tritiummarkierung zu über 50 % erhalten, während sie ausgehend von (*S*)-[4-²H₁, ³H]Butyrolacton unter 50 % sank.

Substrat-Vorstufe	(<i>R</i>)-[4-²H₁, ³H]Butyrolacton								(<i>S</i>)-[4-²H₁, ³H]Butyrolacton			
	hergestellt mit ADH (dpm)				hergestellt mit 4-HBDH (dpm)				hergestellt mit 4-HBDH (dpm)			
	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H Verlust	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H Verlust	³ H	¹⁴ C	³ H/ ¹⁴ C	³ H loss
Malat	1239	914	1,36		4295	1377	3,12		1033	173	5,97	
Malat + Fumarat	361	886	0,41	70%	961	1053	0,91	71%	881	250	3,52	41%

3.7 Mössbauer-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bei Substratbindung

Von der Kristallstruktur ausgehend kann in Abwesenheit von Substrat eine Koordination der Fe-S-Zentren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit drei Cysteinen (Cys99 und Cys103 von der N-Terminalen Domäne; Cys299 von der C-Terminalen Domäne) und einem Histidinrest (His292 von der C-Terminalen Domäne) angenommen werden (Martins et al. 2004). Durch Mössbauerspektroskopie sollen Substrateffekte auf diese Verteilung von 3 zu 1 nachgewiesen werden.

Die Mössbauer Messungen des Enzyms ohne Substrat und externes Magnetfeld zeigen eine nicht symmetrische Drei-Linien Verteilung des Spektrums (Abbildung 23 A). Es kann in drei Quadrupol-Dupletts mit Lorentz'scher Linienverteilung zerlegt werden. Bei einer Temperatur von 4,2 K liegt die Isomerenverschiebung des Hauptanteils (70 % relative Intensität, grün) bei $\delta 0,43 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$ und dessen Quadrupolaufspaltung bei $\Delta E_Q 1,00 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$. Der zweitgrößte Anteil (23% relative Intensität, blau) liegt leicht verschoben bei $\delta 0,37 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$ und dessen Quadrupolaufspaltung bei $\Delta E_Q 0,66 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$. Diese Parameter sind typisch für $\text{Fe}^{2,5+}$ in tetraedrischer S-koordinierter Umgebung (Dickson 1984).

Der Restanteil (7% relative Intensität, rot) hingegen zeigt eine Isomerenverschiebung von $\delta 1,44 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$ und eine Quadrupolaufspaltung von $\Delta E_Q 2,85 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, welche auf High-Spin Fe(II) hinweist. Die Isomerenverschiebung ist jedoch bei Fe(II) in Eisen-Schwefel-Clustern, somit wird dieser Teil des Spektrums unspezifisch an das Protein gebundenen Eisenkernen zugeordnet.

Es läßt sich eine Verteilung der Hauptkomponenten von 3 (grün) zu 1 (blau) Kernen simulieren (Abbildung 23, A). Dies korreliert mit der Kristallstruktur, in der drei Eisenkerne mit Cysteinen koordinieren, während der vierte eine überlange Bindung zum Histidin 292 aufweist. Während der Katalyse könnte dieser Eisenkern die Hydroxylgruppe des Substrats koordinieren, womit eine Verschiebung des Mössbauersignals dieses Kerns im Vergleich zu Proben ohne Substrat zu erwarten wäre.

Die Messung in Gegenwart von Substrat unter gleichen Messbedingungen zeigt eine symmetrischere Signalform, wobei die beiden Hauptkomponenten dieselbe Isomerenverschiebung $\delta 0,43 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, bei verschiedenen Quadrupolaufspaltungen aufweisen. Der Hauptanteil (69 % relative Intensität, grün) hat in diesem Fall eine Quadrupolaufspaltung von $\Delta E_Q 1,01 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$ und der zweitgrößte Anteil (24 % relative

Intensität, blau) eine von ΔE_Q $0,71 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$. Der Restanteil (7% relative Intensität, rot) zeigt gegenüber der Messung ohne Substrat keine sichtbaren Veränderungen der Isomerenverschiebung oder der Quadrupolaufspaltung (Abbildung 23 B).

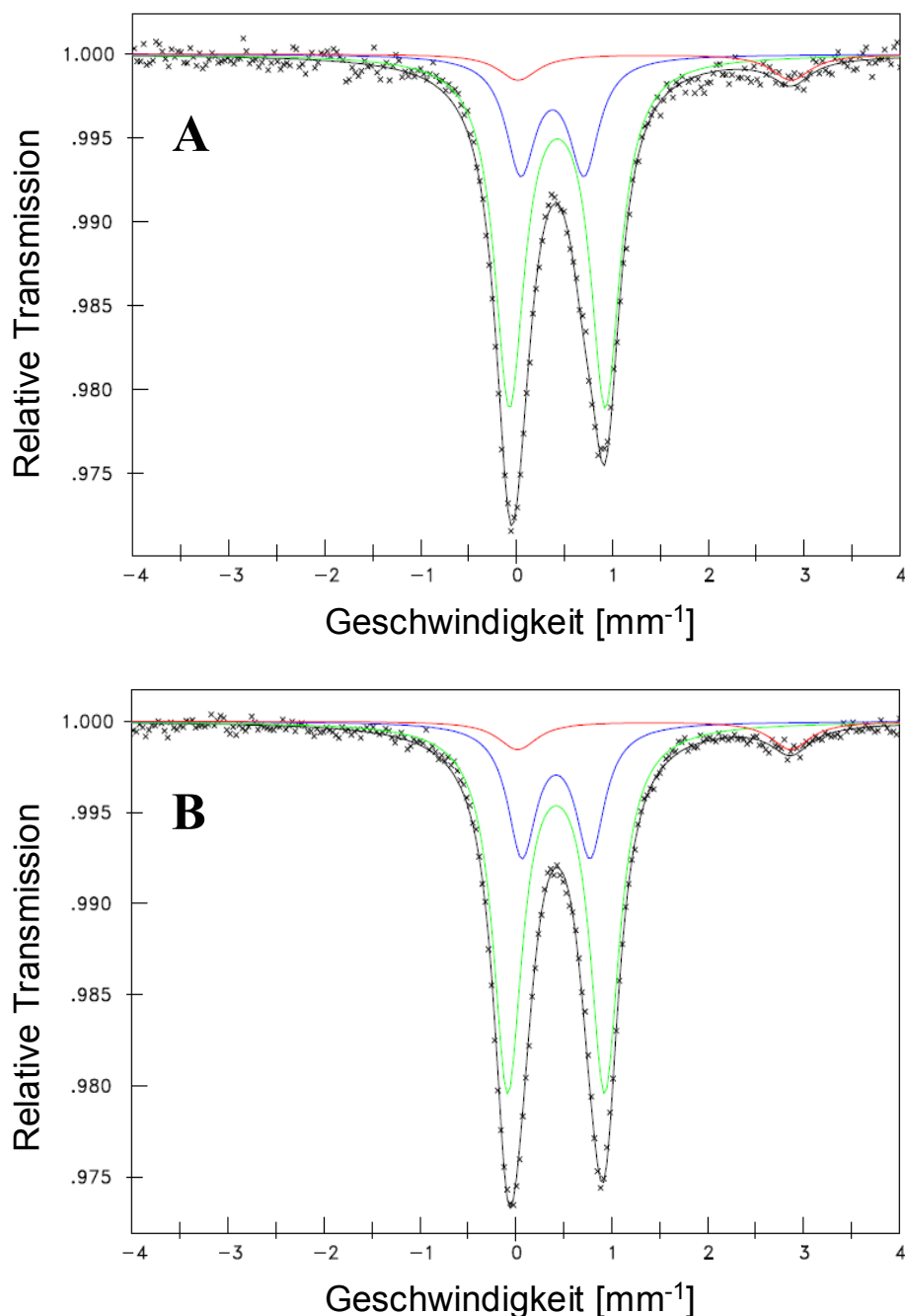


Abbildung 23. Mössbauer-Spektren von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bei 4,2 K im Nullfeld. **A Enzym ohne Substrat:** Subspektrum I (70 % relative Intensität, grün) δ $0,43 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, ΔE_Q $1,00 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, Γ $0,38 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$; Subspektrum II (23% relative Intensität, blau) δ $0,37 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, ΔE_Q $0,66 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, Γ $0,38 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$; Subspektrum III (7% relative Intensität, rot) δ $1,44 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, ΔE_Q $2,85 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, Γ $0,50 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$. **B Enzym mit Substrat Crotonyl-CoA (1,25 mM):** Subspektrum I (69 % relative Intensität, grün) δ $0,43 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, ΔE_Q $1,01 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, Γ $0,37 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$; Subspektrum II (24% relative Intensität, blau) δ $0,43 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, ΔE_Q $0,71 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, Γ $0,36 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$; Subspektrum III (7% relative Intensität, rot) δ $1,44 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, ΔE_Q $2,85 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$, Γ $0,50 \text{ mm} \times \text{s}^{-1}$.

Legt man die beiden Hauptanteile der Messungen im Nullfeld für eine Simulation zu Grunde, so können die Messungen mit externem Magnetfeld (4,2 K, 7,0 T) mit den Mössbauerparametern der Nullfeldmessungen hinreichend genau simuliert werden (Abbildung 24). Hierbei wird ein Verhältniss von drei zu eins bei der Simulation angenommen, jedoch der Anteil an ungebundenem Fe(II) vernachlässigt.

Die magnetischen Hyperfeinaufspaltungen zeigen, dass die einzelnen Eisenkerne nur Reaktionen auf das externe Magnetfeld aufweisen, aber selbst keines ausbilden. Somit kann angenommen werden, dass ihr Spin gekoppelt ist. Zusammen mit den Nullfelddaten kann für die Eisenkerne eine Anordnung in einem $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster mit einem diamagnetischen Grundzustand von $S = 0$ angenommen werden (Müh et al. 1997).

Die hier gemachten Beobachtungen unterscheiden sich von den bisherigen Messungen (Müh et al. 1997), die ein symmetrisches Spektrum in Abwesenheit von Substrat aufwiesen. Sie weisen auf eine Änderung der elektrischen Umgebung eines Eisenkerns in Gegenwart von Substrat hin und bestätigen ausgehend von der Kristallstruktur die angenommene Koordination des Clusters.

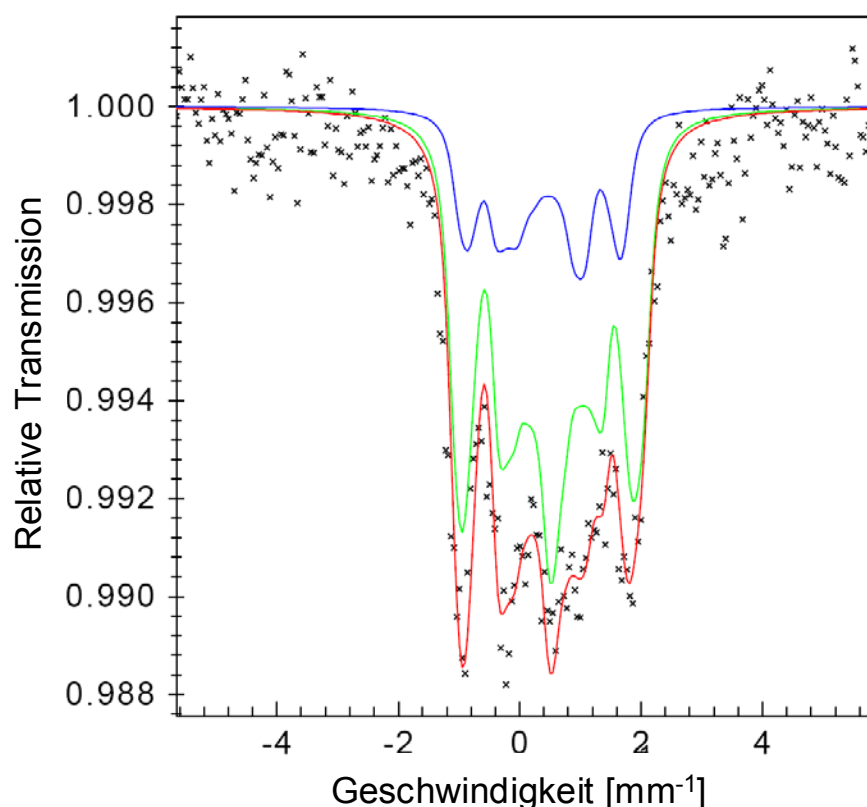


Abbildung 24. Mössbauerspektrum der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bei 4,2 K und externem Magnetfeld von 7 T in Abwesenheit von Substrat: Subspektrum I (75 % relative Intensität, grün) δ 0,48 mm \times s $^{-1}$, ΔE_Q 1,09 mm \times s $^{-1}$, Γ 0,81 mm \times s $^{-1}$; Subspektrum II (25% relative Intensität, blau) δ 0,38 mm \times s $^{-1}$, ΔE_Q -0,68 mm \times s $^{-1}$, Γ 0,74 mm \times s $^{-1}$

3.8 Endor-Spektroskopie - Interaktion von 4-Hydroxy[4-¹³C]butyryl-CoA mit der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Elektron Nuklear Doppelresonanz (ENDOR) Spektroskopie kombiniert EPR-Spektroskopie und NMR-Spektroskopie und ermöglicht die Untersuchung der Elektronendichte an verschiedenen Atomen von organischen Radikalen. Liegt ein EPR-aktives Zentrum (z.B. ein $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster oder ein organisches Radikal) vor können NMR-aktive Kerne bei gleichzeitiger Einstrahlung von Mikrowellen (EPR) und Radiowellen (NMR) mit diesen sogenannte superhyperfeine Kopplungen ausbilden. In früheren Arbeiten ist bereits die Lokalisation des Radikals im Flavinsemichinon untersucht worden. Hierbei wurden Hyperfeinkopplungen der Protonen an der C-8 CH₃-Gruppe (A_{\perp} 7,9 MHz; A_{\parallel} 9,7 MHz, A_{iso} 8,5 MHz) und der C-6 CH-Gruppe (A_{iso} 6,2MHz) bei 14,37 MHz gefunden. Bei Substratbindung verschob sich ausschließlich das Signal der C-8 Protonen, so dass von einer Substratinteraktion ausgegangen wurde (Çinkaya et al. 1997). In EPR- und Mössbauer-Experimenten konnte im nativen Enzym kein reduzierter $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters nachgewiesen werden (Müh et al. 1996; Müh et al. 1997). Jedoch könnte die enge Kopplung des Flavinradikalsignals an ein ungepaartes Elektron eines eventuell reduzierten $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters diesen in Mössbauer und EPR-Messungen maskieren. Diese Kopplung könnte von den 8-Methylprotonen ausgehen (Çinkaya et al. 1997). Mit den üblichen Reduktionsmitteln ist die Erzeugung eines Paramagnetischen EPR-Signals des Clusters ($[4\text{Fe-4S}]^+$) nicht möglich, aber mit Photoreduktion durch Deazaflavin wurde eine teilweise Reduktion beschrieben. Eisen-Schwefel-Cluster als antiferromagnetisch gekoppelten Systemen sind Spinzustände von $S > 0$ zugänglich. Diese werden mit steigender Temperatur verfügbar. Diese sind geradzahlig und durch EPR-Spektroskopie nicht nachzuweisen, aber sie sollten in der Lage sein, benachbarte paramagnetische Zentren zu relaxieren. Es wurde Hinweise auf diese hohen Spinzustände in NMR-Spektroskopie gefunden, wo sogenannte Kontakt-Shifts in den Resonanzen nahegelegener Protonen auftraten (Poe et al. 1990; Bertini et al. 1994). Dieser Effekt sollte auch nachzuweisen sein, wenn andere NMR-aktive Kerne z.B. ¹³C mit dem Cluster interagieren. Der Nachweis einer Substratinteraktion mit dem $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde mit 4-Hydroxy[4-¹³C]butyryl-CoA versucht.

Dabei wurde zunächst ein 35 GHz-EPR-Spektrum der interessanten [¹³C]Probe aufgenommen, welches ein rhombisches Signal überlagert von einem isotropen Signal zeigt (g_{max} 2,04, g_{mid} 2,02, g_{min} 2,00; Abbildung 25) – vergleichbar mit den Messungen mit unmarkiertem Substrat (Abbildung 35, Abschnitt 3.11.2.).

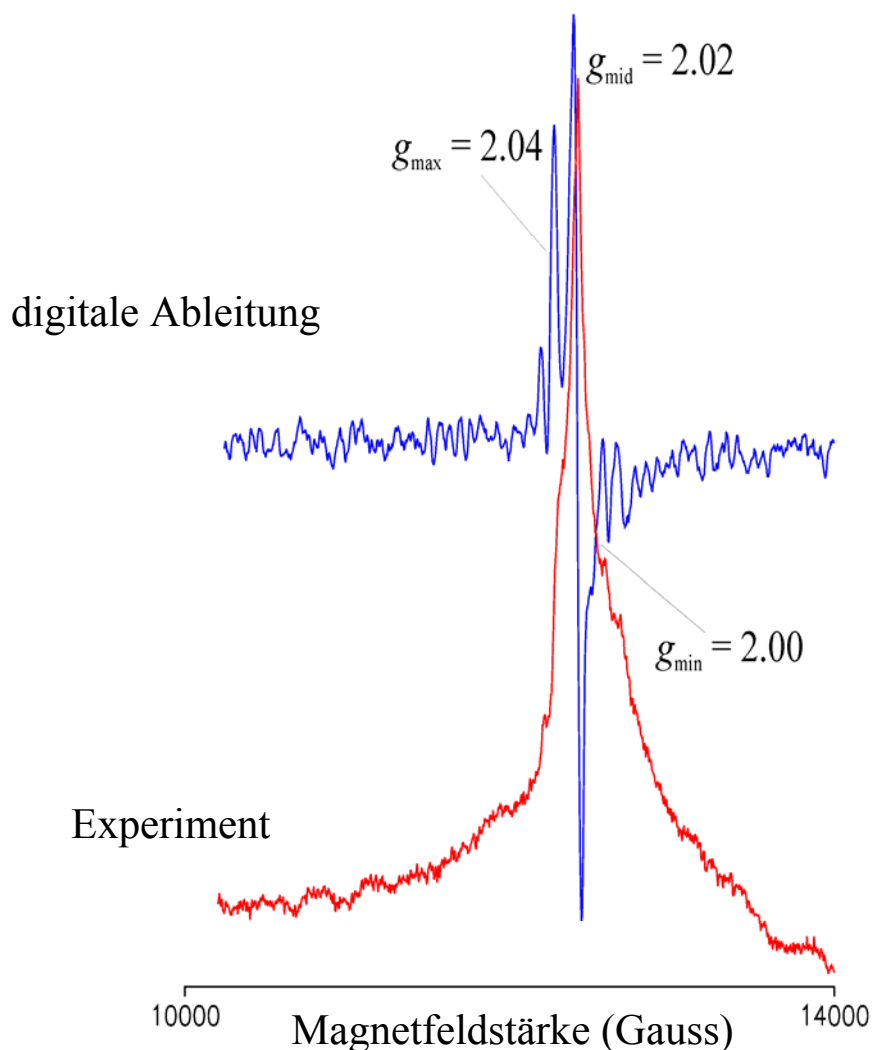


Abbildung 25. 35 GHz-EPR-Spektrum der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit 4-Hydroxy[4- ^{13}C]butyryl-CoA. Messparameter: 35,018 GHz bei 2 K und 40 dB Mikrowellenleistung

Zur Bestimmung der optimalen Einstrahleistung für ENDOR-Spektroskopie wurde die Probe bei unterschiedlicher Mikrowellenleistung (10 dB bis 40 dB) gemessen und die übrigen experimentellen Bedingungen gleich belassen (35,067GHz, 2K). Dabei fällt auf das sich die Form des Spektrums bei unterschiedlicher Leistung ändert (Abbildung 26). Eine zweite abgeleitete Linienform zeigt an, dass die wirkliche Absorption nicht erreicht wird. Dies ist typisch für organische Radikale, die anders als Fe-S-Cluster sich niemals im „schnellen Übergang“ befinden (ein Phänomen das eher Absorptionen als Linien erster Ableitung ergibt; Joshuar Telser, Roosevelt University, Chicago, persönliche Mitteilung). Die zur Messung von ENDOR optimale Mikrowellenleistung (halbe Sättigung des zu untersuchenden Signals) wurde auf 40 dB bestimmt.

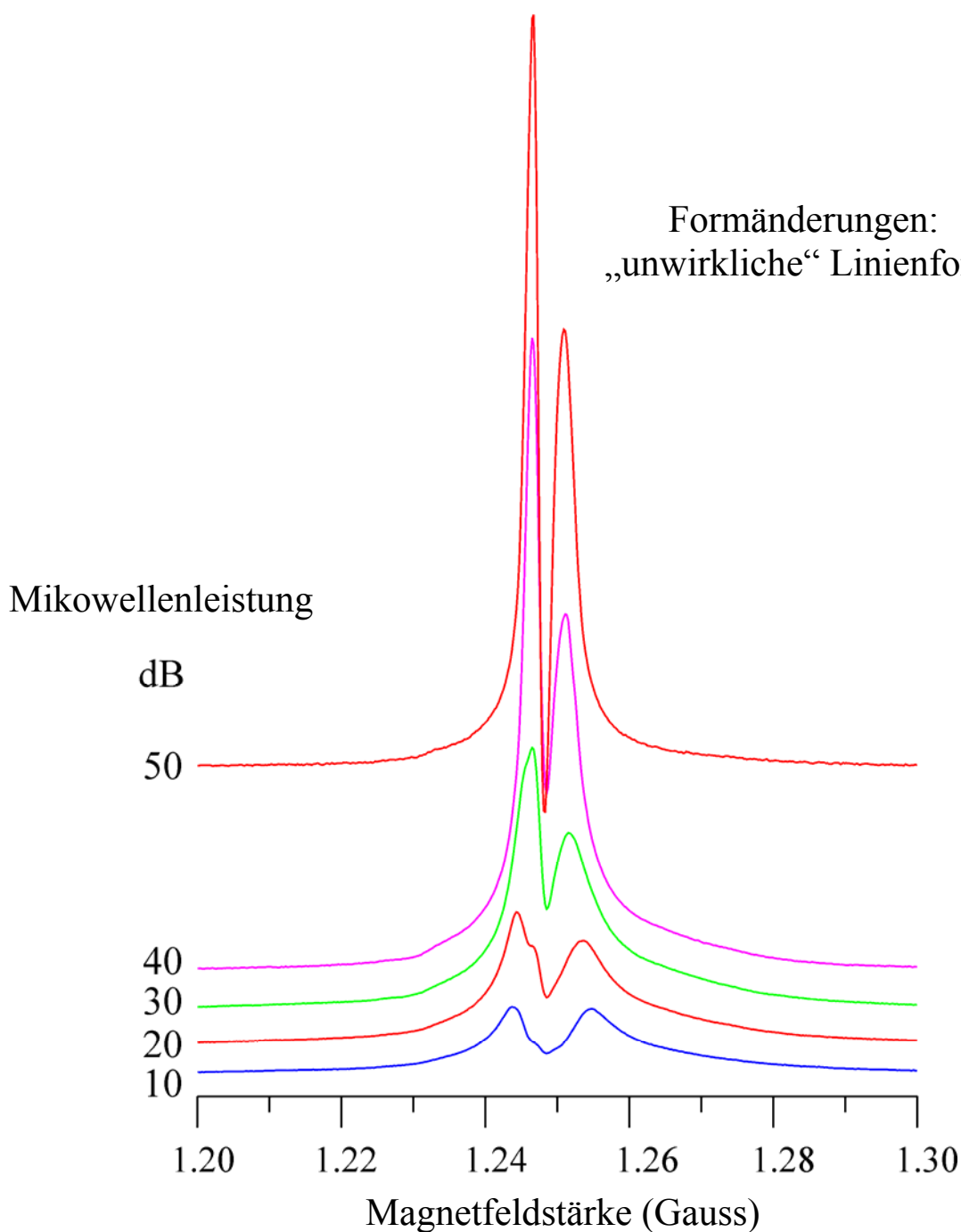


Abbildung 26. 35 GHz EPR-Messung zur Bestimmung der optimalen Mikrowellenleistung für 35GHz-ENDOR der Probe. Messparameter: 35,067 GHz, 2K bei variabler Mikrowellenleistung (10 dB bis 50 dB)

Bei ENDOR-Messungen der Probe, die $[4-^{13}\text{C}]$ Substrat enthielt, zeigen ein für Flavin typisches ENDOR Signal, das um die Larmor Frequenz von Wasserstoff ν_{H} zentriert ist und dem eine maximale Kopplung von Protonen von $A \sim 38$ MHz zugeordnet werden kann (Abbildung 27 A). Der Vergleich des Signals mit einer in D_2O inkubierten Probe von Enzym mit unmarkiertem 4-Hydroxybutyryl-CoA ergibt einen Austausch der Protonen am Flavins

und somit ein vereinfachtes Spektrum (Abbildung 27 B). Die austauschbaren Protonen können dem N5 des Flavins zugeordnet werden. Die Hyperfeinkopplung dieser Protonen beträgt $A_{\perp} \sim 25$ MHz, $A_{\parallel} \sim 38$ MHz. Die isotropische Hyperfeinkopplung kann nach $A_{\text{iso}} = 1/3 (2 A_{\perp} + A_{\parallel})$ ermittelt werden und beträgt $A_{\text{iso}} \sim 29,3$.

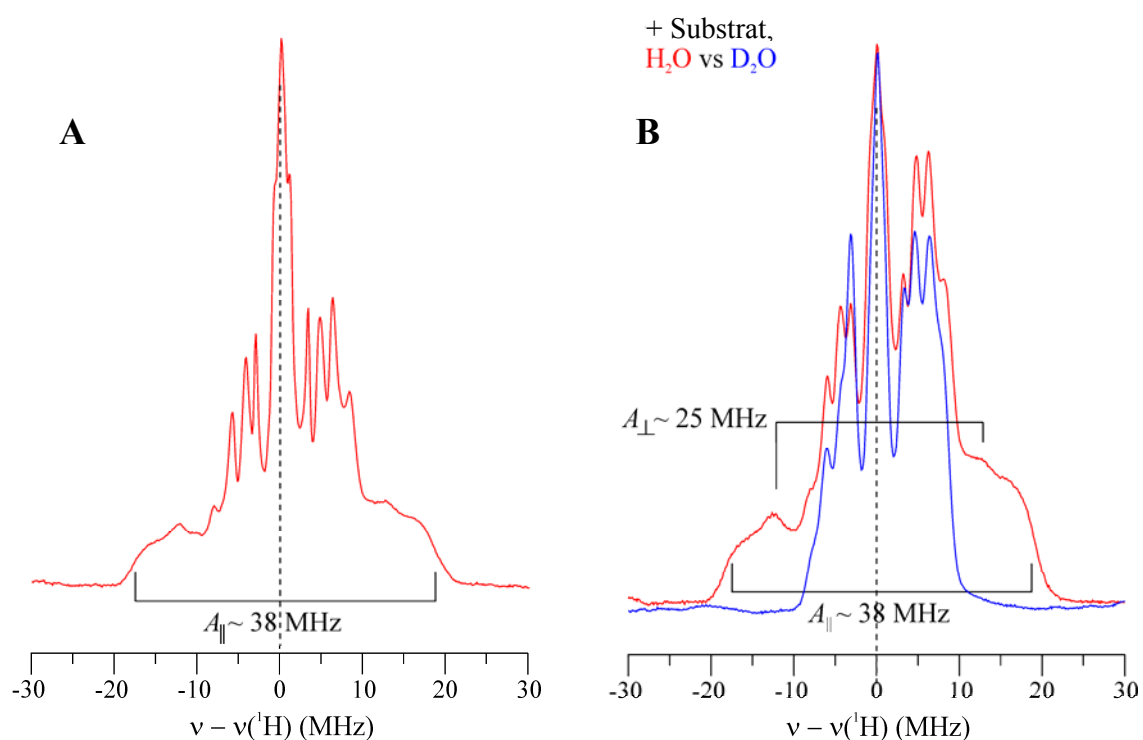


Abbildung 27. ^1H -ENDOR zentriert auf das Signal des Flavinsemichinonradikals bei g 2,003. Messparameter (35,067 GHz, 2 K, 40 dB). **A.** Enzym inkubiert mit 4-Hydroxy[4- ^{13}C]butyryl-CoA in H_2O . **B.** Überlagerung von **A.** mit einer Probe die Enzym und unmarkiertes Enzym in D_2O enthielt.

Eine genauere Darstellung des Effektes der Substratbindung auf das Flavin wurde aufgrund des vereinfachten Spektrums in D_2O durchgeführt. Hierbei ergeben sich Spektren zentriert um die Larmor Frequenz von Deuterium (Abbildung 28). Die Matrixregion stellt hierbei nur den natürlichen Anteil von Deuterium dar und ist gegenüber den ausgetauschten Protonen des N5 sehr schwach. Diese haben eine Hyperfeinkopplung von $A(^2\text{H}) \sim 4$ MHz, was mit der Kopplung der N5-Protonen des Flavinsemichinonradikals der Probe in H_2O $A(^1\text{H}) \sim 25$ MHz korreliert.

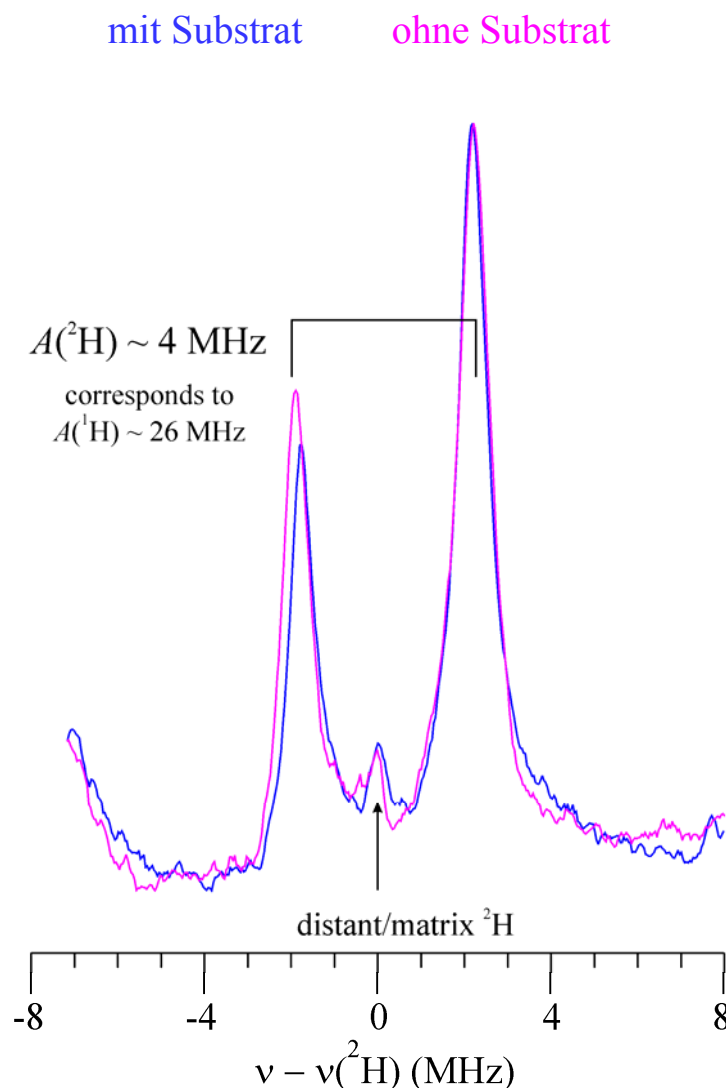


Abbildung 28. Überlagerung der ^2H -ENDOR-Spektren von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit (blau) und ohne (pink) Substrat bei g 2,003. Messbedingungen: 35 GHz, 50 dB, 2K, + 0,5 MHz/s Scanrate

Wird das ^1H -ENDOR Experiment bei den anderen auffälligen g -Werten des EPR-Spektrums durchgeführt, so ergibt sich für 4-Hydroxybutyryl-CoA ohne Substrat in H_2O dieselbe starke Kopplung von $A(^1\text{H}) \sim 23$ MHz bei verschiedenen g -Werten (Abbildung 29 A). Am ausgeprägtesten ist sie bei g 2,086. Es könnte eine noch stärkere Kopplung vorliegen, jedoch ist die Basislinie nicht ideal um dies genau zu bestimmen. In D_2O ergibt sich ein sehr scharfes Signal, das nur den Matrixprotonen zugeordnet werden kann, und das keinerlei Kopplungen zu einem paramagnetischen Zentrum zeigt (Abbildung 29 B).

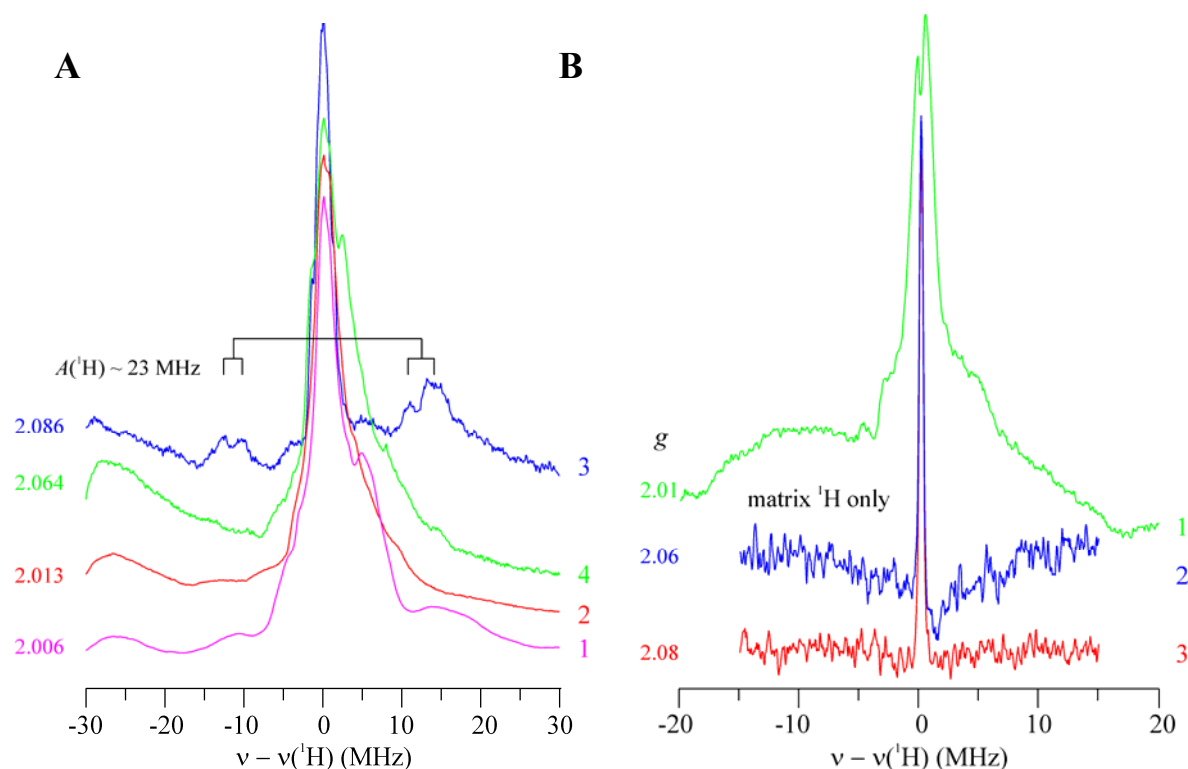


Abbildung 29. ^1H -ENDOR von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ohne Substrat bei verschiedenen g -Werten: **A** in H_2O , **B** in D_2O .

Die ^1H - und ^2H -ENDOR Experimente der Probe, die mit ^{13}C markiertes Substrat enthielt, bei den g -Werten, die typischerweise Eisenschwefelzentren zugeordnet werden, zeigen keine Interaktion mit einem ^{13}C markierten Substrat (Daten nicht gezeigt). Ein Signal, welches ^{13}C Interaktionen anzeigt, wurde auch bei g -Werten nicht entdeckt, die dem Flavin oder Substratradikalen zugeordnet werden könnten (Abbildung 30).

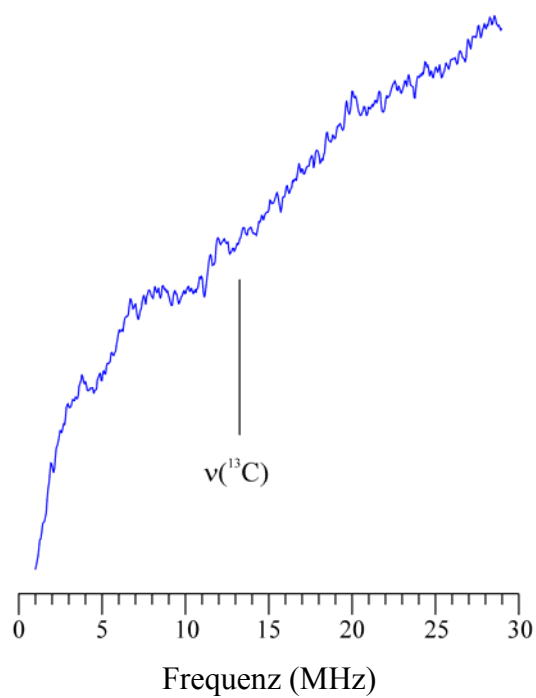


Abbildung 30. ^1H -ENDOR der Enzymprobe inkubiert mit 4-Hydroxy[4- ^{13}C]butyryl-CoA in H_2O zentriert im Bereich des Signal des Flavinsemichinonradikals und möglicher organischer Substratradikale bei g 2,011. Messparameter (35,067 GHz, 2 K, 40 dB, 32 ms Zeitkonstante, + 1 MHz/s Scanrate). Die Larmorfrequenz von ^{13}C von 13 MHz ist markiert.

3.9 Ammonium-Lyaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Bei vorläufigen Messungen zur Optimierung der Messparameter und Reaktionsbedingungen der MALDI-TOF MS Messungen der Reaktion von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA traten häufig Signale auf, die ein Dalton unter dem bei der Reaktion erwarteten Massen lagen. Beispielsweise wurde ausgehend von 4-Hydroxybutyryl-CoA ($m/z = 854$ Da) ein Signal bei 853 Da gefunden. Bei Crotonyl-CoA gab es kein Signal unter der erwarteten Masse von 836 Da. Die Übertragung von Ammoniak auf Acrylyl-CoA zu β -Alanyl-CoA (Herrmann et al. 2005) zeigt eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen. Die Bildung einer NH_2 -Gruppe (16 Da) bewirkt gegenüber der Bildung einer OH-Gruppe (17 Da) eine um 1 Da geringere Massenzunahme. Alle bis dahin verwendeten Enzympräparationen enthielten Ammoniumsulfat von den vorherigen Chromatographieschritten. Ein Umpuffern der verwendeten Enzyme in komplett ammoniumsulfatfreien Kaliumphosphatpuffer (50 mM pH 7,4) beseitigte das Phänomen. Es wurde im Weiteren für alle anderen Untersuchungen (für z.B. Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) darauf geachtet, dass die verwendeten Lösungen kein Ammoniumsulfat enthielten. Bei der Übertragung eines Ammoniak- anstatt eines Wassermoleküls auf Crotonyl-CoA durch die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase würde analog zum Mechanismus für die Wasseraddition 4-Aminobutyryl-CoA ($m/z = 853$ Da) entstehen. Jedoch wäre auch eine Addition an Crotonyl-CoA in 3-Position möglich, wie für Acrylyl-CoA bereits beobachtet wurde (Herrmann et al. 2005).

Im Folgenden werden in Gegenwart von 100 mM Ammoniumsulfat auftretende Produkte der Dehydratasereaktion mit MALDI-TOF-MS gezeigt (Abbildung 31). Für einen Vergleich der Integrale der monoisotopischen Massen der Produkte müssen die Signale getrennt betrachtet werden. Hierfür wird die theoretische Verteilung der natürlichen Isotope in einer Verbindung anhand ihrer Summenformel errechnet. Für die beteiligten CoA-Ester ergeben sich folgende Verteilungen:

- Crotonyl-CoA 836 Da (Int: 100), 837 Da (Int: 32,5), 838 Da (Int: 12,8)
- 4-Hydroxybutyryl-CoA 854 Da (Int: 100), 855 Da (Int: 31,6), 856 Da (Int: 13,0)
- Aminobutyryl-CoA 853 Da (Int: 100), 854 Da (Int: 31,9), 855 Da (Int: 12,9)

Der Wert des Integrals des Signals bei 853 Da ergibt also die Werte für die ihm zugehörigen Signale bei 854 Da und 855 Da. So kann das Integral für die monoisotopische Masse von 4-Hydroxybutyryl-CoA (854 Da) für Vergleiche mit den anderen Integralen bereinigt werden.

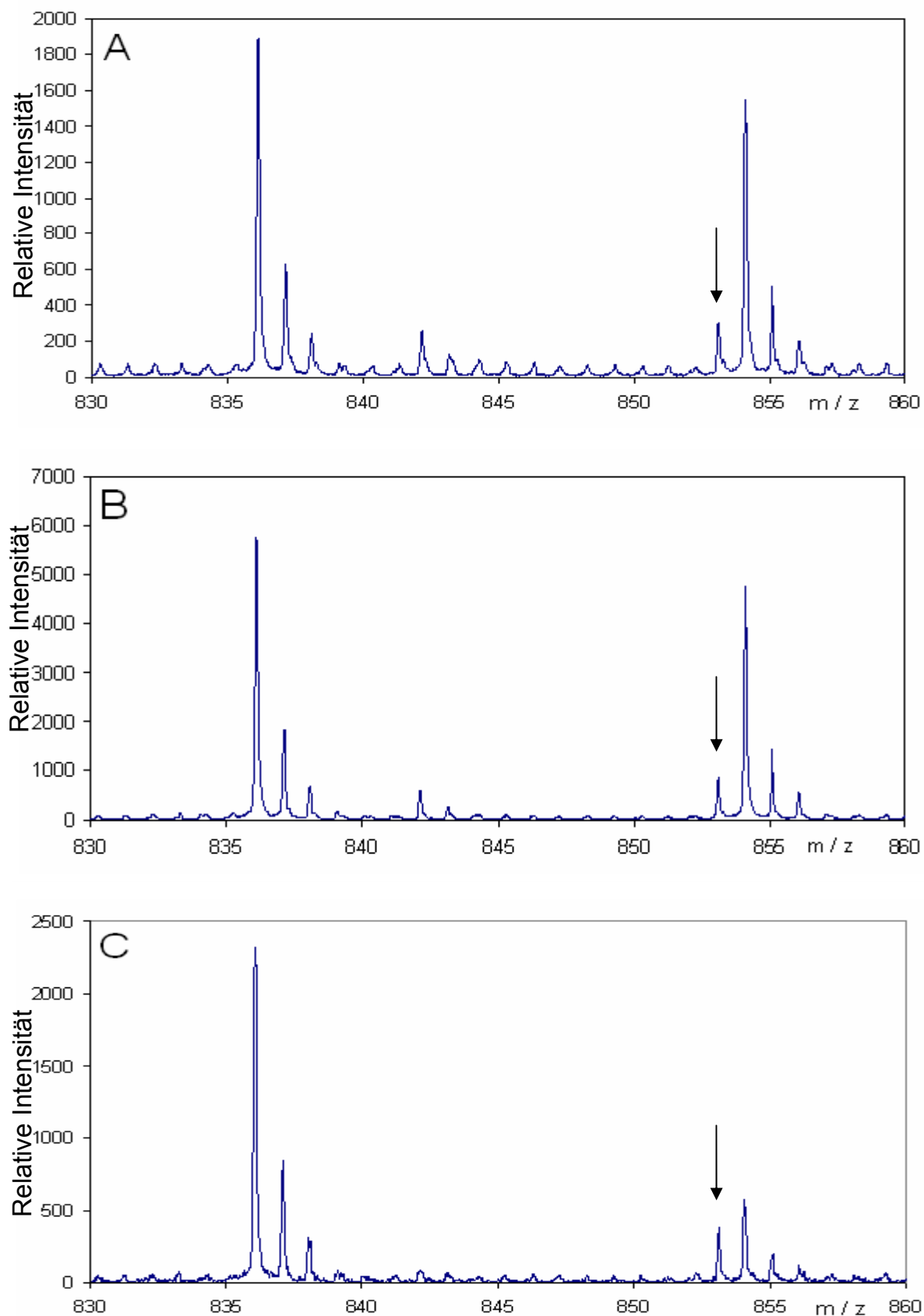


Abbildung 31. MALDI-TOF-MS. Das Spektrum von Crotonyl-CoA zeigt (836 Da) nach Inkubation mit 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und 100 mM Ammoniumsulfat bei verschiedenen pH-Werten (**A:** pH 7,5; **B:** pH 8,0; **C:** pH 8,5) Signale bei 854 Da (4-Hydroxybutyryl-CoA) und 853 Da (Aminobutyryl-CoA; siehe Pfeil).

Da bei MALDI-TOF-MS jede Verbindung unterschiedlich auf die Matrix reagiert und dadurch zu unterschiedlich hohen Anteilen ionisiert wird, kann aus dem Verhältnis der Signalstärken kein direkter Rückschluss auf die Konzentrationsverhältnisse in der Probe gezogen werden. Ein Vergleich innerhalb einer Probenserie, der nur relative Änderungen der Stoffkonzentrationen zueinander feststellt, ist jedoch möglich, da die Proben unter denselben Bedingungen gereinigt und gemessen wurden.

Tabelle 5 A. Produktintegrale der Reaktion von Crotonyl-CoA mit Dehydratase in Gegenwart von Ammoniumsulfat als Rohdaten bei pH 7,5 bis 8,5 (4-Hydroxybutyryl-CoA-Integral bereinigt vom Aminobutyryl-CoA-Anteil)

	Substanz	Monoisotopische Masse in Da	Integrale zu den jeweiligen Massen [rel. Einheiten]						
			836	837	838	853	854	855	856
pH 7,5	Crotonyl-CoA	836	17689	5680	2114	0	0	0	0
	Aminobutyryl-CoA	853	0	0	0	2720	868	351	82
	4-Hydroxybutyryl-CoA	854	0	0	0	0	13342	4013	1822
pH 8,0	Crotonyl-CoA	836	52986	16599	6059	0	0	0	0
	Aminobutyryl-CoA	853	0	0	0	6928	2210	894	208
	4-Hydroxybutyryl-CoA	854	0	0	0	0	38803	10879	4342
pH 8,5	Crotonyl-CoA	836	21715	6555	2905	0	0	0	0
	Aminobutyryl-CoA	853	0	0	0	2739	874	353	82
	4-Hydroxybutyryl-CoA	854	0	0	0	0	3919	1119	852

Die Rohdaten der Integrale (Tabelle 5, A) erlauben eine relative Darstellung der Intensitäten zu Crotonyl-CoA. Die relativen Intensitäten der Signale (normalisiert auf Crotonyl-CoA) von 4-Hydroxybutyryl-CoA nehmen zunächst von 75 (pH 7,5) auf 73 (pH 8,0) leicht und danach auf 18 (pH 8,5) stark ab.

Tabelle 5 B. Verhältnis von Crotonyl-CoA zu 4-Hydroxybutyryl-CoA und Aminobutyryl-CoA in Abhängigkeit vom pH-Wert

	Substanz	Monoisotopische Masse in Da	Gesamtproduktanteil in %	Anteile normalisiert auf Crotonyl-CoA	Verhältnis Amino- zu 4-Hydroxybutyryl-CoA
pH 7,5	Crotonyl-CoA	836	52	100	1 : 5
	Aminobutyryl-CoA	853	8	15	
	4-Hydroxybutyryl-CoA	854	40	75	
pH 8,0	Crotonyl-CoA	836	54	100	1 : 5,6
	Aminobutyryl-CoA	853	7	13	
	4-Hydroxybutyryl-CoA	854	40	73	
pH 8,5	Crotonyl-CoA	836	77	100	1 : 1,5
	Aminobutyryl-CoA	853	10	12	
	4-Hydroxybutyryl-CoA	854	14	18	

Die relativen Intensitäten der Signale von Aminobutyryl-CoA nehmen kontinuierlich von 15 (pH 7,5) über 13 (pH 8,0) bis 12 Anteile (pH 8,5) ab (Tabelle 5, B). Bei steigendem pH (7,5 über 8,0 bis 8,5) verschiebt sich auch das Verhältnis der Produkte in Richtung 4-Aminobutyryl-CoA (1:5 über 1:5,6 bis 1:1,5). Das geringere Auftreten von Produkten mit steigendem pH-Wert ist durch die Instabilität von 4-Amino- und 4-Hydroxybutyryl-CoA-Estern erklärbar, welche ein Lactam bzw. Lacton bilden können und somit die CoA-Esterbindung spalten. Die Zunahme des Anteils an Aminobutyryl-CoA im Produktgemisch bei pH 8,5 könnte durch die im Basischen höhere Verfügbarkeit von NH_2 als Partner für die Reaktion bedingt sein oder eine im Basischen höhere Hydrolysestabilität des 4-Aminobutyryl-CoA im Vergleich zu dem 4-Hydroxybutyryl-CoA bedeuten. Da der Vergleich verschiedener Substanzen über MALDI-TOF MS nicht das Verhältnis ihrer absoluten Konzentrationen bestimmen kann, kann hier nur eine relative Änderung des Verhältnisses in Richtung zu Aminobutyryl-CoA festgestellt werden und eine relativ zur Menge an Crotonyl-CoA geringere Bildung von Produkten mit steigendem pH-Wert.

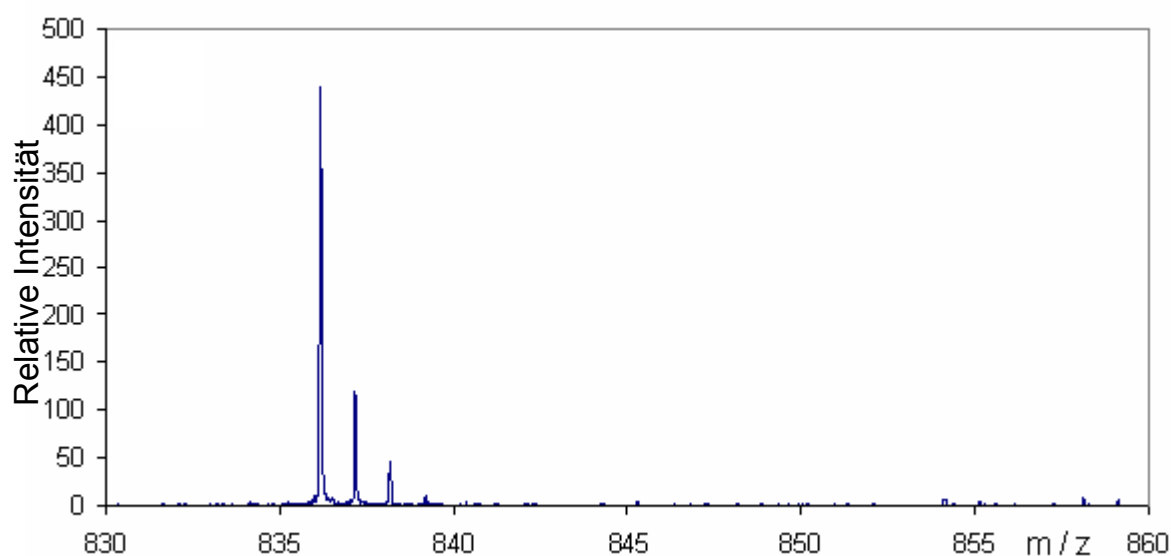


Abbildung 32. MALDI-TOF Massenspektrum von Crotonyl-CoA ($m/z = 836$ Da) zeigt nach Inkubation bei pH 7,5 mit 100 mM Ammoniumsulfat kein Signal mit einer Masse von 853 Da. Bei pH 8,0 und pH 8,5 wurden gleichartige Spektren gemessen; ebenfalls ohne spontanen Austausch.

Bei allen weiteren Experimenten zur Stereoselektivität ausgehend von 4-Hydroxybutyryl-CoA wurde ein Auftreten eines Signals bei 853 Da in Abwesenheit von Ammoniumsulfat nicht beobachtet (vgl. Abschnitt 3.1). Ein Test auf spontanen Austausch bei verschiedenen pH-Werten zeigte keine spontane Addition des Ammoniaks (ein Signal von 853 Da) an die Doppelbindung von Crotonyl-CoA (Abbildung 32).

3.10 UV-Vis – substratabhängiger Übergang vom Benzo- zum Semichinon

Das charakteristische Absorptionsspektrum von Flavinen ändert sich abhängig von ihrem Oxidationszustand. Der Flavinkofaktor der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase kann in drei verschiedenen Oxidationszuständen vorliegen. Das vollständig oxidierte Flavinbenzochinon wird nach Teilreduktion in Flavinsemichinon und nach vollständiger Reduktion in Flavinhydrochinon überführt. Die verschiedenen Oxidationstufen unterscheiden sich durch charakteristische Absorption in UV-Vis zwischen 400 und 800 nm. Das Benzochinon zeigt dabei die stärkste Absorption bei 430 nm (für den ungebundenen Kofaktor (Dawson et al. 1987): $\text{FAD } \epsilon_{450} = 11,3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$; $\text{FADH}_2 \epsilon_{450} = 0,98 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), während das Semichinon dort eine deutlich verringerte Absorption und zusätzlich eine sog. „charge-transfer“-Bande bei 500 – 800 nm aufweist. Diese wird auf die Interaktion zwischen Flavinen oder Fe-S-Clustern und Substraten zurückgeführt. Die vollständige Reduktion zu Hydrochinon bleicht die Absorption bei 430 nm auf das Hintergrund Niveau der $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren, die eine relativ breite Absorption mit einer Schulter bei 400 nm zeigen, und entfernt die „charge-transfer“-Bande (Çinkaya 2002).

Da für die Dehydratase im oxidierten Zustand die höchste spezifische Aktivität berichtet wurde, kann für den Mechanismus angenommen werden, dass ausgehend vom Benzochinon durch Oxidation des Enoxylats während der Katalyse ein Semichinonradikal erzeugt wird, welches durch die Bildung des Dienoxy-Radikal-Intermediats auf den Benzochinonzustand reoxidiert wird (Müh et al. 1996; Çinkaya 2002). Diese Effekte werden genutzt, um die Interaktion des Flavinkofaktors der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit verschiedenen CoA-Estern zu testen. Bei Gabe des natürlichen Substrats sollte ohne zusätzliche Reduktionsmittel das vorher mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidierte Enzym seine Absorption bei 438 nm verringern, was typisch für den Übergang zur Semichinonform wäre. Als Hinweis auf Elektronentransfer vom Substrat sollte sich außerdem eine „charge-transfer“-Bande zwischen 500 und 800 nm bilden. Es wurde allerdings auch das Auftreten von „charge-transfer“-Phänomenen durch Interaktion von nicht natürlichen Substraten wie z.B. CoA-S-S⁻ mit Flavinen (Engel und Massey 1971; Hetzel et al. 2003) beschrieben. Einige Substrate z.B. Acetyl-CoA sollten nicht als Elektronendonator für eine Reaktion mit der Dehydratase in Frage kommen. Butyryl-CoA wiederum könnte analog zum Mechanismus der Butyryl-CoA-Dehydrogenasen Teile der Reaktion durchlaufen. Vorausgegangene EPR-Studien haben gezeigt, dass Signale von neutralem Semichinonradikalen jedoch auch bei alleiniger Gabe von

CoASH auftreten (Näser et al. 2005). Dieses Phänomen wurde zunächst photometrisch (300 nm bis 800 nm) und danach mit EPR Spektrometrie untersucht. Dabei sollte bestimmt werden, welchen Einfluss verschiedene Substrate auf Ausmaß und Geschwindigkeit der Elektronenübertragung vom Substrat zum Flavin haben.

Zeitabhängige ebenfalls anaerob aufgenommene UV-Vis-Spektren bei gleichen Ausgangskonzentrationen von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase [7,3 μ M in Benzochinonform nach Oxidation mit Kaliumhexacyanoferrat(III)] wurden bei 438 nm und 739 nm verglichen. Die Kontrolle ohne Substrate zeigte eine geringe Abnahme bei 438 nm und einen leichten Anstieg bei 739 nm. Die Inkubation mit Crotonyl-CoA führte bei 438 nm zu einer sofortigen Abnahme (1,5 auf 1,25) der Absorption, die im Folgenden nahezu konstant blieb, und bei 739 nm zu einem sofortigen Anstieg (0,15 auf 0,19), der im Verlauf von 60 Minuten wieder zurück ging. Bei Zugabe von Butyryl-CoA zeigte sich bei 438 nm eine kontinuierliche Abnahme (1,5 auf 1,3) und bei 739 nm ein sofortiger Anstieg der Absorption (0,15 auf 0,18), die jeweils im Folgenden konstant blieb. Acetyl-CoA bewirkt nach Zugabe eine kaum von der Kontrolle abgehobene Verringerung bei 438 nm (1,5 auf 1,43); allerdings ist eine deutliche Zunahme der Absorption bei 739 nm zu verzeichnen (0,15 auf 0,2 nach 50 min und 0,22 nach 2h). Freies Coenzym A bewirkt eine deutliche Abnahme bei 438 nm (1,5 auf 1,35) und eine Zunahme der Absorption bei 739 nm (0,15 auf 0,23; Abbildung 33).

Die Geschwindigkeit, mit der die Umwandlung von Flavinbenzochinon zu Flavinsemichinon stattfindet, ist abhängig vom Substrat. Hier zeigt sich, dass CoASH und Butyryl-CoA einen vergleichbaren Effekt auf die Bildung von Flavinsemichinon haben, während Crotonyl-CoA eine unmittelbare und unter den experimentellen Bedingungen nicht zeitliche auflösbare Umwandlung zur Folge hat. Obwohl bei Zugabe von Acetyl-CoA eine „charge-Transfer“-Bande auftritt, weist die Absorptionsänderung bei 438 nm nur auf ein geringe Umwandlungsrate von Flavinbenzochinon zu Flavinsemichinon hin.

Die mögliche Quelle für die Elektronenübertragungen zum Flavin wären je nach Substrat unterschiedlich: Freies Coenzym A könnte ein Thiylradikal bilden, während Butyryl-CoA den Reaktionszyklus bis zur Stufe des Enoxy- oder Ketylradikals durchlaufen könnte. Acetyl-CoA zeigt die geringsten Effekte. Nach initialer Deprotonierung wäre die Oxidation des resultierenden Enolats zum Enoxiradikal denkbar. Eine weitere Möglichkeit der direkten Reduktion von Acetyl-CoA zu einem Ketylradikal ist energetisch ungünstig.

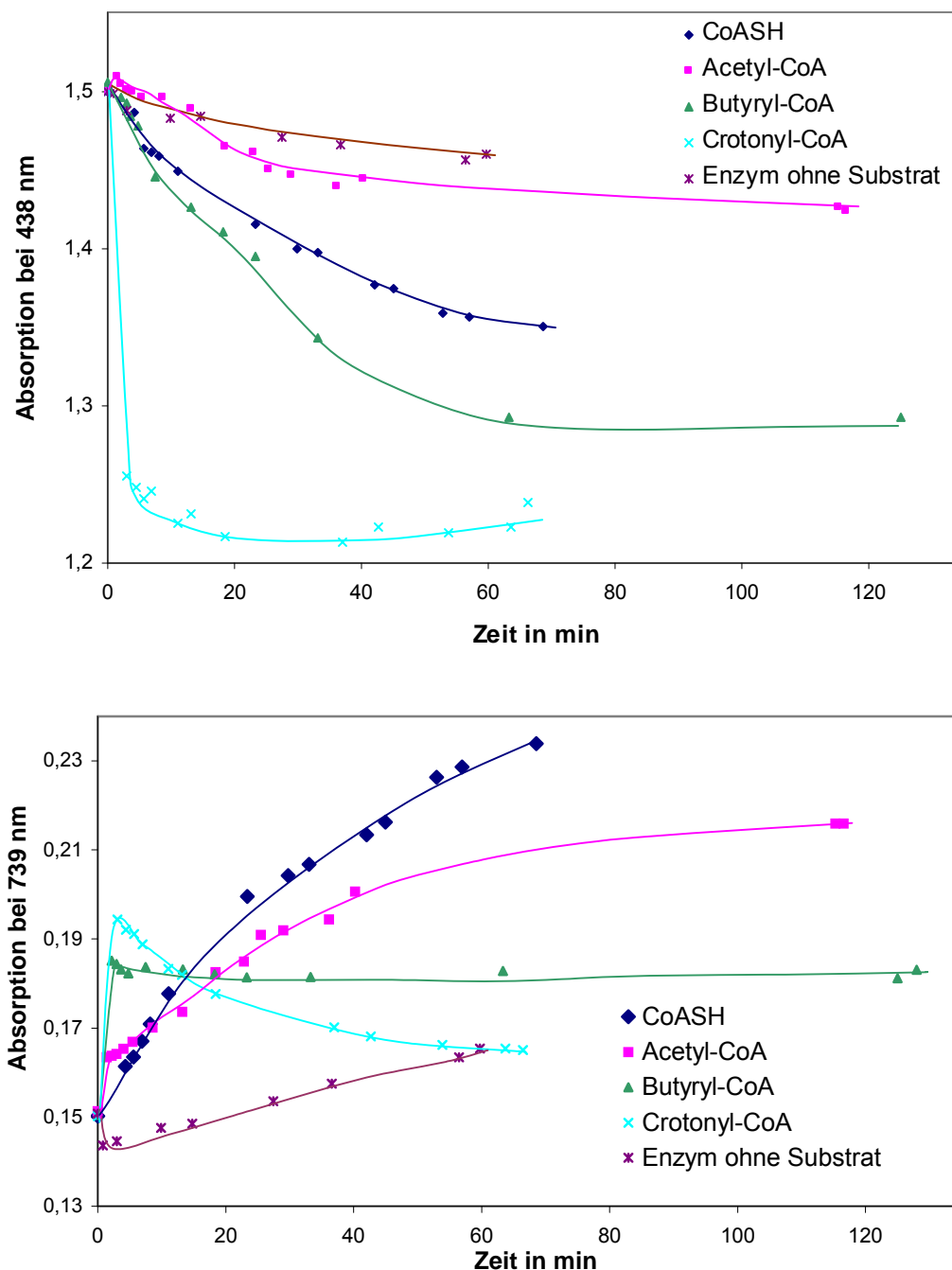


Abbildung 33. Substratabhängige Absorptionsänderung von zuvor mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: **A** bei 438 nm (Reduktion des FAD-Kofaktors in die Semichinonform); **B** bei 739 nm (stellvertretend für den Bereich 500-800 nm zur Beobachtung der „charge-transfer“-Bande)

Die hier betrachteten an der Katalyse beteiligten Elemente der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase sind das Flavin und der Komplex aus [4Fe-4S]Cluster und Substrat. Von den drei möglichen Zuständen des Flavins lässt sich nur das Flavinsemichinonradikal durch EPR nachweisen. Von den möglichen Zuständen des [4Fe-4S]-Clusters (1+ / 2+ / 3+) sind die 1+-Form und die 3+-Form EPR aktiv, wobei die 3+-Form noch nicht nachgewiesen wurde. Die 1+-Form ist möglicherweise als Lewis-Säure an der Katalyse beteiligt ist.

3.11 EPR – Effekte verschiedener Substrate auf die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Der Flavinkofaktor der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wurde zunächst mit Kaliumhexacyanoferrat(III) oxidiert und damit in die EPR inaktive Benzochinonform gebracht. Aus den vorangegangenen photometrischen Untersuchungen zur Umwandlung des Flavinkofaktors von der Benzo- in die Semichinonform ergibt sich die Frage, ob unterschiedliche Substrate ebenfalls einen zeitabhängig unterschiedlich schnellen Anstieg der Spinkonzentrationen an Flavinradikalsignalen bewirken. Werden nach Substratzugabe Flavinsemichinonradikale gebildet, kann deren Konzentration bestimmt werden und ein eventueller Unterschied zu einer zu einem späteren Messpunkt bei 10 Minuten eingefrorenen Probe als Vergleich herangezogen werden.

Der Nachweis von organischen Radikalen, welche ihren Ursprung in den verwendeten Substraten haben, soll über Messungen bei 10 bzw. 18 K erfolgen. Die für organische Radikale (z.B. Ketylradikale) typischen Signale sind ca. 30 bis 60 Gauss breit (Kim et al. 2008) und liegen genauso wie Flavinradikale bei g – Werten von ca. 2,00 (Müh et al. 1996; Näser et al. 2005). Obwohl die meisten organischen Radikale schon bei Raumtemperatur ein Signal aufweisen, ist in Nachbarschaft zu paramagnetischen Zentren eine Spinkopplung mit diesen möglich, welche das Signal unterdrücken würde. Bei Raumtemperatur stellt der, ansonsten im $S = 0$ (EPR inaktiv) Zustand befindliche, $[4Fe-4S]^{2+}$ -Cluster angeregte höhere Spinzustände zur Verfügung, die für eine Kopplung mit benachbarten Radikalen zur Verfügung stehen (vgl. Abschnitt 3.8). Dieses Phänomen führt z.B. bei der 2-Hydroxyisocaproyl-CoA-Dehydratase dazu, dass das Substratradikal erst unter einer Temperatur von 70 K detektiert werden kann [(Kim et al. 2008) und Antonio Pierik, Philipps-Universität Marburg, persönliche Mitteilung].

In einem System wie der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ist eine Überlagerung eventueller Signale vom $[4Fe-4S]$ -Cluster sowie hypothetischer Substratradikale mit dem Flavinsemichinonradikal zu erwarten. Diese könnten erst nach Subtraktion der Anteile des bei den Experimentalttemperaturen (10-18 K) gesättigten Flavinradikalsignals durch Differenzspektren der Dehydratase mit freiem Coenzym A oder dem natürlichen Substrat Crotonyl-CoA hervorgehoben werden.

Die verwendeten Substrate bieten jeweils leicht unterschiedliche Reaktionsbedingungen, welche über Vergleiche der Spektren die Möglichkeit bieten, neu auftretende Radikalspezies mit dem jeweiligen Substrat zu identifizieren. Da die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase auch Ammonium-Lyase Aktivität aufweist (siehe Abschnitt 3.9), wurde zusätzlich zu den für die photometrischen Untersuchungen verwendeten Substraten auch in Gegenwart von Ammoniumsulfat getestet. Wird Ammoniumsulfat im Überschuss zu Crotonyl-CoA zugegeben, so entsteht durch die Reaktion der Dehydratase ein Gleichgewicht zwischen 4-Hydroxybutyryl-CoA, Crotonyl-CoA und vermutlich 4-Aminobutyryl-CoA. Da sowohl aus Mössbauerstudien (Abschnitt 3.7), als auch aus den Experimenten zur Konfiguration der Methylgruppe (Abschnitt 3.6) sowie der Kristallstruktur (Martins et al. 2004) eine mögliche Beteiligung des [4Fe-4S]-Clusters an der Katalyse durch Koordinierung der Hydroxylgruppe und als Lewis-Säure vermutet wird (Martins et al. 2004; Buckel und Golding 2006; Friedrich et al. 2008a; Friedrich et al. 2008b), könnte ein Austausch des Liganden an dieser Stelle durch Stickstoff eine leichte Änderung des EPR-Signals bewirken.

Zum Vergleich von Signalintensitäten und Spinkonzentrationen werden die EPR-Signale doppelt integriert. Dabei wird allerdings der Anteil von Signalen mit schmaler Bandbreite am Gesamtintegral unterschätzt. So kann eine sichtbare starke Amplitudenänderung im schmalen isotropen Anteil vor dem Hintergrund der breiten Anteile des rhombischen Signals nur einen geringen Effekt haben. Auch sind die Messungen bei 10 K bis 18 K für die Bestimmung der Spinkonzentration von Flavinradikalen nicht geeignet, da diese bei diesen Temperaturen zu stark gesättigt sind. So können bereits leichte Schwankungen der Temperatur große Änderungen der Signalintensität bewirken.

Generell wird durch Schwankungen in Temperatur, Magnetfeld, Wanddicke der EPR-Gefäße und durch unvermeidbare Unterschiede in der Positionierung der Proben im Gerät ein relativer Fehler von 5 % angenommen. Abweichungen in der Füllhöhe der Proben bewirken nur dann eine Änderung der Signalintensitäten, wenn eine zu geringe Füllhöhe den Einstrahlbereich der Mikrowellen betrifft.

3.11.1 Zeitliche Abhängigkeit der Spinkonzentrationen von Substrat und Inkubationszeit bei 77 K

Der Hauptfokus der Messungen bei 77 K liegt auf Lage und Spinkonzentration der Flavinradikalsignale, die bei diesen Temperaturen nicht von den rhombischen Signalen überlagert werden, welche die Fe-S-Anteile und möglicher Substratradikale repräsentieren könnten. Ausgehend von den photometrischen Untersuchungen (Abschnitt 3.10) wird eine Zunahme der Spinkonzentration der Flavinsignale in Abhängigkeit von der Zeit und dem verwendeten Substrat erwartet. Diese wird durch eine Umwandlung des Flavins vom EPR inaktiven Benzochinon- in den EPR aktiven Semichinonradikalzustand erklärt.

Ein Vergleich der Proben, die direkt nach Substratzugabe bei einer Minute eingefroren worden waren (Abbildung 34), zeigt das erwartete typische isotrope Signal des neutralen Semichinonradikals bei allen Substraten. Die Lage und Breite des Signals unterscheidet sich nicht abhängig von den verwendeten Substraten. Die erwartete Zunahme der Spinkonzentrationen im Vergleich der zeitverzögert eingefrorenen Proben wird nicht signifikant, jedoch lässt sich in der Tendenz die stärkste Zunahme bei den Proben mit Coenzym A und Crotonyl-CoA beobachten (Tabelle 6). Es kann daher angenommen werden, dass die Reaktion zum größten Teil bereits abgelaufen sein muss, bevor es gelang, die erste Probe nach einer Minute einzufrieren. Dieser Effekt kann bei den Crotonyl-CoA-Proben erklärt werden, indem hier eine maximale substratinduzierte Sättigung des Enzyms mit Flavinsemichinon schon in weniger als einer Minute erfolgt sein und nur eine kleine zeitliche Änderung feststellbar sein sollte. Die Zunahme mit Coenzym A hingegen entspricht tendenziell der langsamen Umwandlung von Flavinbenzochinon zu dem Flavinsemichinonradikal, wie ausgehend von den photometrischen Messungen vermutet wurde (Tabelle 6).

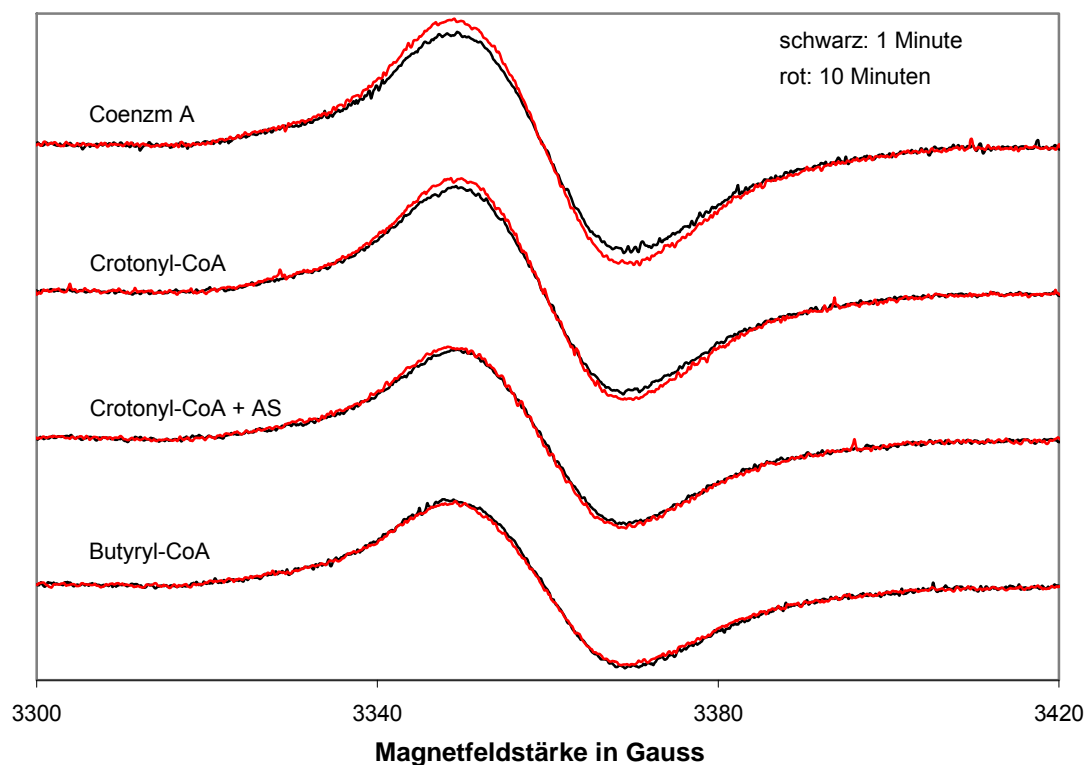


Abbildung 34. EPR-Spektren von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (41,7 μM) bei 77 K: Inkubation mit unterschiedlichen Substraten (je 5 mM CoASH, Crotonyl-CoA, Crotonyl-CoA + Ammoniumsulfat und Butyryl-CoA) ergab das typische isotrope Flavinsemichinonsignal, das sich in Lage und Breite nicht unterscheidet, aber dessen Intensität sich abhängig vom Substrat mit der Zeit ändert (1 Minute, 10 Minuten).

Der prozentuale Anteil der Flavinradikale pro aktivem Zentrum zeigt außerdem, dass die Inkubation mit den verschiedenen Substraten eine nahezu gleich starke Umwandlung vom oxidierten Flavinbenzochinon, das nicht EPR aktiv ist, zum neutralen Flavinsemichinonradikal bewirkt hat (Tabelle 6). Somit zeigt sich kein deutlicher Effekt der verschiedenen Substrate.

Tabelle 6. Spinkonzentrationen der Flavinsemichinonradikale der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (9,0 mg / ml, 41,7 μM / 167 μM aktive Zentren) bei unterschiedlichen Substraten in Abhängigkeit von der Zeit (1 Minute, 10 Minuten)

Substrat (5mM nach Gehalt an Coenzym A)	Zeit in [Minuten]	[Flavinradikal] in μM	Änderung von t 1 zu t 10 Minuten in %	[Radikal] / [aktive Zentren] in %
CoASH	1	9,2	11,7	5,5
Crotonyl-CoA	1	8,1	8,9	4,9
Crotonyl-CoA + AS	1	6,9	4,1	4,2
But-CoA	1	7,1	-1,7	4,3
CoASH	10	10,2		6,1
Crotonyl-CoA	10	8,8		5,3
Crotonyl-CoA + AS	10	7,2		4,3
But-CoA	10	7,0		4,2

3.11.2 Vergleich der Effekte verschiedener Substrate auf Spinkonzentrationen und Auftreten neuer Signale bei 10 – 18 K

Die für die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bisher durchgeführten Messungen mit freiem Coenzym A und 4-Hydroxybutyryl-CoA, welches aufgrund des Gleichgewichts der Reaktion äquivalent zu Crotonyl-CoA ist, zeigen ein isotropes dem Flavin und ein möglicherweise ein zu Eisen-Schwefel-Zentren zugeordnetes rhombisches Signal, die einander überlagern und hypothetische Substratradikale beinhalten könnten (Müh et al. 1996; Näser et al. 2005).

Die im Folgenden exemplarisch beschriebenen Spektren für freies Coenzym A und für das natürliche Substrat Crotonyl-CoA dienen als Referenz für einen Vergleich mit den übrigen Substraten und der Literatur. Die aufgenommenen Spektren wiesen in ihren grundlegenden Elementen große Ähnlichkeiten auf. Es zeigte sich in allen Proben das bekannte mehrschichtige Signal aus einer isotropen Komponente, die das Flavinsemichinon repräsentiert, und einer rhombischen Komponente, welche Substratradikale (im Fall von Crotonyl-CoA [Edukt: Enoxy-Radikal / Intermediat: Ketylradikal / Produkt: Dienoxy-Radikal]) und/oder den $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster repräsentieren könnte (Abbildung 35). Hier werden nur abweichende Signalformen, welche in den Spektren mit den übrigen Substraten auftraten, kurz in ihren Unterschieden vorgestellt werden.

Die Messungen mit verschiedenen lang inkubierten Proben (1 Minuten; 10 Minuten) zeigen für keines der gemessenen Substrate signifikante zeitliche Unterschiede in den g -Werten der Signalkomponenten (Tabelle 7) oder den Spinkonzentrationen (Tabelle 8), jedoch wurde hier nur ein Vergleich zwischen Spektren durchgeführt, die bei gleichen Temperaturen aufgenommen worden waren.

Die leichte Zunahme Spinkonzentration der Proben, die Crotonyl-CoA bzw. Crotonyl-CoA und Ammoniumsulfat enthalten (Tabelle 8), liegen nicht deutlich über dem relativen experimentellen Fehler von 5 %. Außerdem sollte die Zunahme der Spinkonzentration für das natürliche Substrat unmittelbar und nicht erst im Verlauf von 10 Minuten erfolgen. Die relativ geringe Abnahme der Spinkonzentration für CoASH und Butyryl-CoA liegt noch innerhalb eines experimentellen Fehlers von 5 %. Auch ist eine Zunahme der Spinkonzentration des Flavinsemichinonsignals als Faktor der Inkubationszeit mit dem Substrat zu erwarten, jedoch ist diese bei 10 K durch Sättigung des Semichinonsignals und Auftreten von breiten Eisen-Schwefel-Signalen und möglicherweise Substratradikalen nicht genau zu bestimmen.

Tabelle 7. Gegenüberstellung der g-Werte der verschiedenen Substrate

Probe (oxidiert)	Zeit in [Minuten]	Temp. in [K]	g-Wert 1 / in Gauss	g-Wert 2 / in Gauss	g-Wert 3 / in Gauss	g-Wert 4 / in Gauss
CoASH	1	10	2,031 3327	2,005 3371	1,966 3438	1,911 3536
CoASH	10	10	2,032 3327	2,005 3371	1,966 3439	1,910 3538
Crotonyl-CoA	1	10	2,032 3326	2,004 3372	1,967 3436	1,910 3538
Crotonyl-CoA	1	18	2,031 3328	2,005 3370	1,966 3438	1,910 3538
Crotonyl-CoA	10	18	2,031 3327	2,005 3370	1,967 3427	1,911 3537
Crotonyl-CoA + AS	1	10	2,032 3326	2,004 3372	1,967 3435	1,911 3536
Crotonyl-CoA + AS	10	10	2,032 3326	2,004 3372	1,967 3436	1,912 3535
Butyryl-CoA	1	10	2,032 3326	2,007 3368	1,966 3437	1,909 3540
Butyryl-CoA	1	18	2,032 3326	2,007 3368	1,966 3437	1,908 3542
Butyryl-CoA	10	18	2,032 3326	2,007 3368	1,966 3438	1,910 3539

Ein Vergleich der Signalintensitäten zwischen Proben mit verschiedenen Substraten wurde nur zwischen Spektren durchgeführt, die bei gleichen Temperaturen aufgenommen worden waren. Eine Gegenüberstellung von bei 10 K und 18 K aufgenommenen Spektren zeigt generell eine Signalverbreiterung bei Temperatursteigerung und eine Verringerung der Signalintensitäten sowohl allgemein als auch besonders im rhombischen Anteil (Spektren nicht gezeigt, Tabelle 8). Dies ist durch eine geringere Energieaufnahme der rhombischen Anteile (z.B. Eisen-Schwefel-Cluster oder organische Radikale) bei höheren Temperaturen zu erklären.

Tabelle 8. Spinkonzentrationen im Überblick: Crotonyl-CoA und (Crotonyl-CoA mit AS) zeigen eine leichte Zunahme nach 10 Minuten

Substrat (5 mM nach Gehalt an Coenzym A)	Zeit in [Minuten]	Temperatur in [K]	[Radikal] in [µM]	[Radikal] / [Aktive Zentren] in %	Änderung von 1 zu 10 Minuten in %
CoASH	1	10	5,1	3,1	-0,8
CoASH	10	10	5,1	3,0	
Crot-CoA + AS	1	10	4,6	2,8	8,1
Crot-CoA + AS	10	10	5,0	3,0	
But-CoA	1	10	4,4	2,6	
Crotonyl-CoA	1	10	4,8	2,9	
Crotonyl-CoA	1	18	4,5	2,7	6,6
Crotonyl-CoA	10	18	4,8	2,9	
But-CoA	1	18	4,5	2,7	-3,2
But-CoA	10	18	4,4	2,6	

Obwohl die insgesamt Spinkonzentrationsänderung nicht signifikant wird, zeigt jedoch ein Vergleich bei allen Proben nach 10 Minuten eine verstärkte Zunahme im rhombischen Anteil bei $g_1 = 2,032$. Bei Proben, die Butyryl-CoA enthielten, war dieser Anstieg besonders ausgeprägt, während er bei freiem Coenzym A nicht feststellbar war. Dies könnte ein Hinweis auf ein Substratradikal sein, wenn bei Differenzspektren ein scharfes Signal mit der für organische Radikale typischen Breite von 20 bis 60 Gauss mit dieser Zunahme korreliert werden kann.

Alle anderen zeitlichen Änderungen liegen unterhalb des experimentellen Fehlers. Die Radikalkonzentrationen der oxidierten Proben liegen bei 2,6 % bis 3,1 % der aktiven Zentren, ohne einen deutlichen Effekt der verschiedenen Substrate zu zeigen. Der Vergleich zu den bei 77 K ermittelten Spinkonzentrationen des isotropen Anteils (Tabelle 6) zeigt, dass die Flavinradikalkonzentration durchschnittlich 1,9 mal über der der übrigen Radikale liegt.

Für einen direkten Vergleich der Effekte der verschiedenen Substrate können die Signalformen der Proben, die nach einer Minute Inkubation mit den Substraten eingefroren worden waren, bei 10 K verglichen werden (Abbildung 35). Hierbei können die relativen Signalstärken des isotropen Signals und der verschiedenen Anteile des rhombischen Signals auf die verwendeten Substrate zurückgeführt werden, da alle anderen experimentellen Bedingungen (Magnetfeldstärke, Mikrowellenfrequenz und -stärke, Empfängerempfindlichkeit, pH-Wert, Enzymkonzentration, CoA-Esterkonzentration und Inkubationszeit) konstant gehalten wurden.

Sollten Substratradikale oder Änderungen der Signale zu finden sein, welche den Fe-S-Cluster repräsentieren, so wären die erwarteten Änderungen im rhombischen Anteil lokalisiert oder durch Überlagerung mit dem isotropen Signal des Flavinradikals verborgen.

Da bei 10 K das Semichinonradikal abgesättigt ist, können Änderungen in der Amplitude des isotropen Signals nicht verlässlich auf Substrateffekte zurückgeführt werden. Bei der Betrachtung der Signalform des Flavinsemichinonsignals und angrenzender Bereiche zeigt sich allerdings in der Probe mit Crotonyl-CoA eine zusätzliche Verbreiterung im Vergleich mit der Probe die nur Enzym und Coenzym A enthielt (Abbildung 35). Im rhombischen Anteil des Signals bei $g_1 = 2,032$ (3326 Gauss) zeigen sich in der Reihenfolge Crotonyl-CoA, Crotonyl-CoA mit Ammoniumsulfat, CoASH und Butyryl-CoA nur geringe Intensitätsunterschiede. Jedoch liegt die Signalintensität der Butyryl-CoA-Probe dort erkennbar niedriger und es zeigt sich im Bereich zwischen 3380 und 3425 Gauss (Signal um

$g_3 = 1,966$) eine zusätzliche Schulter (Abbildung 35). Darüber hinaus tritt eine geringe Verschiebung im Signal für Butyryl-CoA ($g_2 = 2,007$, 3368 Gauss) gegenüber dem Durchschnitt der anderen isotropen Signale ($g_2 = 2,005$, 3371 Gauss) auf, die jedoch nicht signifikant ist.

Diese Änderungen könnten auf die Überlagerung mit rhombischen Signalkomponenten zurückgeführt werden, deren Lage zwischen Butyryl-CoA und Crotonyl-CoA unterschiedlich ist.

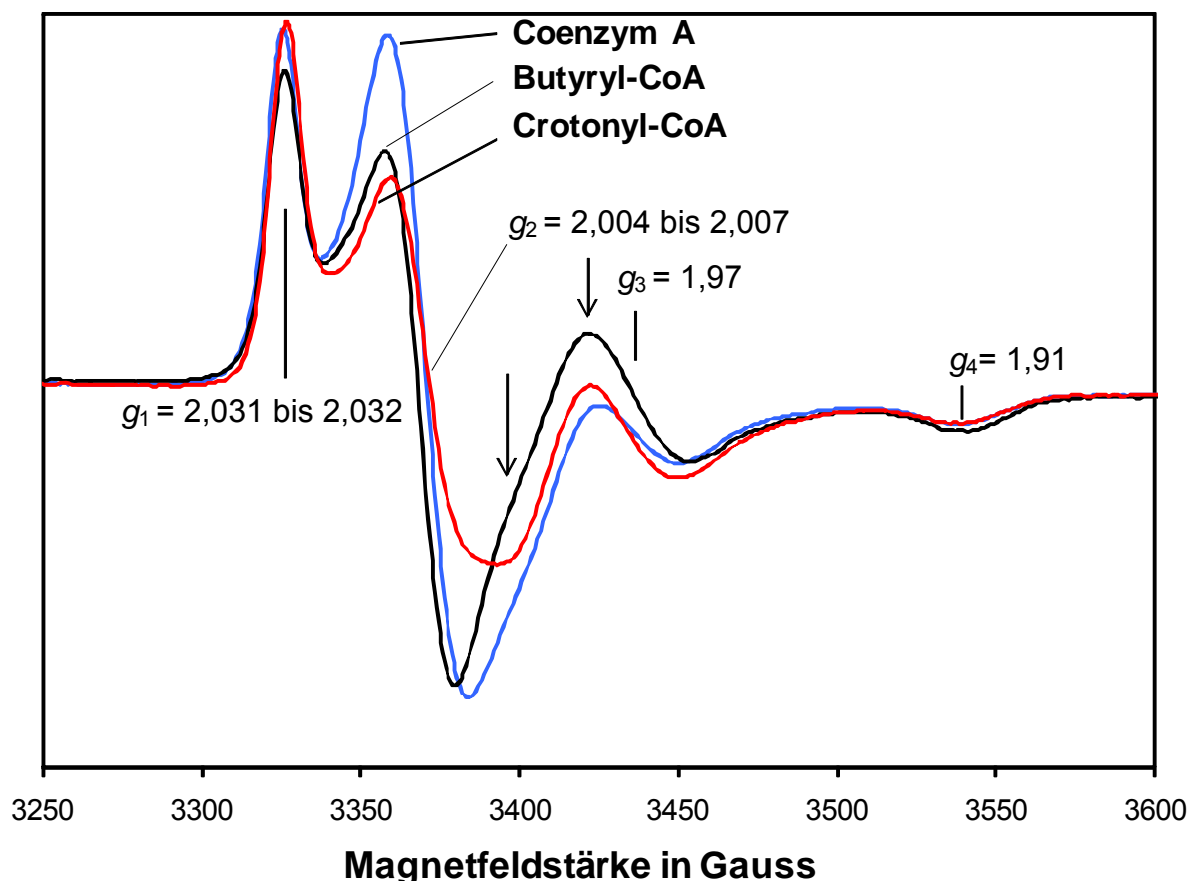


Abbildung 35. EPR-Spektren der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (41,7 μM) bei 10 K, eingefroren nach einer Minute und mit verschiedenen Substraten (5 mM). Eine bei Butyryl-CoA zusätzlich auftretende Schulter des Signals im Bereich zwischen 3375 und 3425 Gauss (Signal um $g_3 = 1,966$) ist mit Pfeilen hervorgehoben.

Die abweichenden Signalformen in den Proben mit Crotonyl-CoA und Butyryl-CoA (Abbildung 35) könnten ein Hinweis auf ein für die Reaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase postuliertes Substratradikalintermediat sein (Müh et al. 1997; Buckel und Golding 1999). Ein Vergleich dieser Proben mit Coenzym A über ein Differenzspektrum zeigt hier die zusätzlich auftretenden Signale, die auf den Einfluss der jeweils veresterten Säure (4-Hydroxybuttersäure, Buttersäure) zurückgeführt werden können. Hierbei wird das Spektrum mit freiem Coenzym A so skaliert, dass unveränderliche Anteile wie das isotrope

Flavinsemichinonradikalsignal komplett subtrahiert und zuvor überlagerte Signale hervorgehoben werden. Hieraus gehen für alle verwendeten Substrate rhombische Signale hervor. Diese können nur eingeschränkt quantifiziert werden, da das für den Angleich der Skalierung verwendete isotrope Semichinonradikalsignal im genutzten Temperaturbereich von 10 bis 18 K gesättigt und damit Intensitätsschwankungen unterworfen ist. Jedoch kann ein qualitativer Vergleich der g -Werte des rhombischen Signals durchgeführt werden (Tabelle 9).

Wird das erhaltene Differenzspektrum wiederum als Grundlage für einen Vergleich der Probe mit freiem Coenzym A genutzt, so werden nur die Anteile im Spektrum hervorgehoben, welche auf die Interaktion des Enzyms mit freiem Coenzym A ohne veresterte Säure zurückzuführen sind. Es zeigt sich hierbei, dass das zuvor eliminierte Signal des Semichinonradikals isoliert werden kann, indem die rhombischen Anteile voneinander subtrahiert werden (Spektren nicht gezeigt).

Ein Vergleich dieser beiden Differenzspektren kann somit zur Identifizierung neuer Radikalspezies genutzt werden, indem zuvor überlagerte, aber vom Signaltyp her ähnliche Signale getrennt dargestellt werden können. Dies könnten beispielsweise zwei in ihrer Umgebung leicht unterschiedliche rhombische Fe-S-Signale sein, die durch Interaktion mit unterschiedlichen Substraten nun unterschiedliche g -Werte aufweisen. Auf diese Weise könnten aber auch Signale im Bereich um $g = 2,00$ mit einer Breite von 30-60 Gauss hervortreten, welche Substratradikalspezies darstellen könnten, die zuvor vom Semichinonradikal überlagert worden waren.

Tabelle 9. Gegenüberstellung der g -Werte für alle Differenzspektren, sofern diese eindeutig zuzuordnen waren.

Differenzspektrum aus Anteil 1 - Anteil 2				
Anteil 1	Anteil 2	g_1	g_3	g_4
Butyryl-CoA	CoASH	2,031	1,966	1,907
Crotonyl-CoA	CoASH	2,031	1,968	1,909
Crotonyl-CoA mit Ammoniumsulfat	Crotonyl-CoA	2,034	1,967	1,911
Crotonyl-CoA	Crotonyl-CoA, photoreduziert	2,032	1,967	1,910
CoASH	CoASH, hv	2,032	1,966	1,908

Die mit Ammoniumsulfat und Crotonyl-CoA inkubierten Enzymproben zeigten keine deutlichen Effekte in Amplitude oder Signalform gegenüber der Probe, die nur Crotonyl-CoA enthielt (Spektrum nicht gezeigt, vergleiche Abbildung 35). Für Differenzspektren ergaben sich keine von den Ursprungssignalen abweichende g -Werte (Spektrum nicht gezeigt, Tabelle

9). Daher kann davon ausgegangen werden, dass entweder keine neuen Radikalspezies oder Interaktionen mit dem Cluster auftreten oder der Anteil an 4-Aminobutyryl-CoA im Gleichgewicht zu Crotonyl-CoA zu gering ist um messbare Effekte zu erzeugen.

Um zu untersuchen, ob die zusätzliche Schulter bei 3375 bis 3425 Gauss (Signal um $g_3 = 1,966$) und die verstärkte Signalintensität bei g -Wert 2,032 (3326 Gauss) im Spektrum mit Butyryl-CoA auf eventuelle Substratradikalspezies hindeuten, wurde das Spektrum mit dem in Gegenwart von CoASH und dem für das natürliche Substrat Crotonyl-CoA erhaltenen verglichen.

Die Proben 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit Butyryl-CoA bzw. Crotonyl-CoA zeigen in der Differenz zu der Probe mit Coenzym A ebenfalls ein rhombisches Signal welches 30 % bzw. 50 % über den temperaturbedingten Schwankungen (Skalierung des Semichinonradikals) liegt. Das Differenzsignal nach Subtraktion des Flavinantils zeigt für die Butyryl-CoA-Probe gegenüber den Ursprungsspektren eine prominente Verbreiterung des Anteils im Bereich zwischen 3375 und 3425 Gauss (Signal um $g_3 = 1,966$; Abbildung 36 B). Während das Differenzsignal der bei Inkubation der Dehydratase mit Crotonyl-CoA keine signifikanten Verschiebungen in den g -Werten gegenüber den Ursprungssignalen zeigt (Abbildung 36 A).

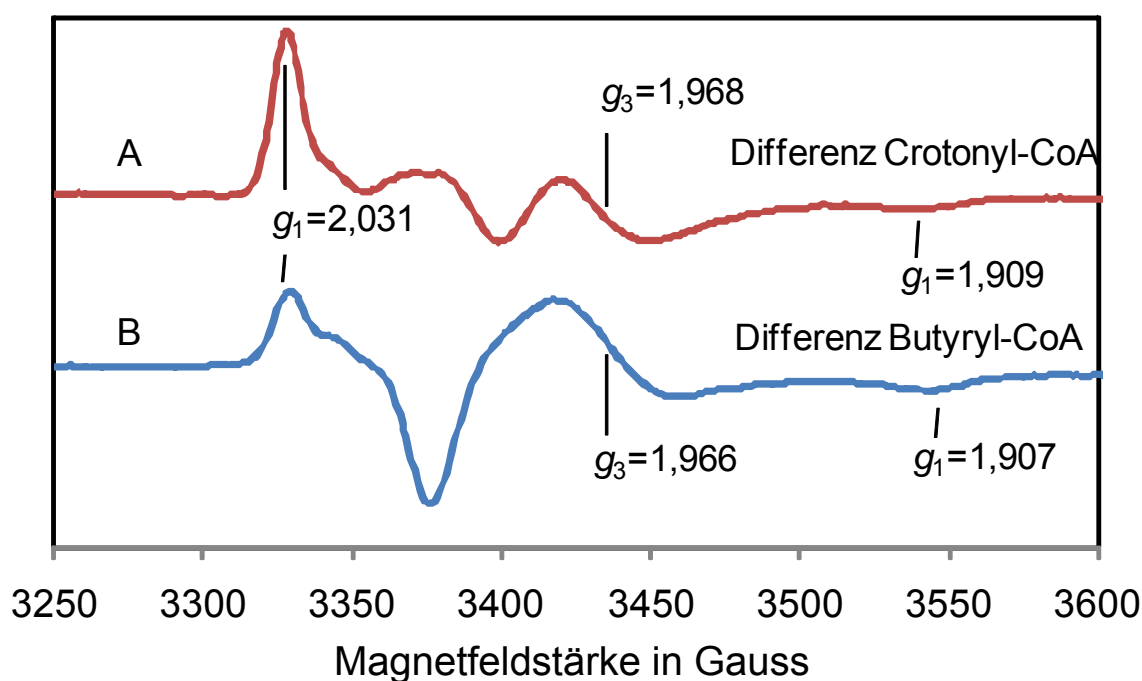


Abbildung 36. EPR-Differenzspektren von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (41,7 μ M) bei 10 K: **A.** zwischen den Substraten Crotonyl-CoA (5 mM) und Coenzym A (5 mM; CoASH Anteil mit 0,57 skaliert); **B.** zwischen den Substraten Butyryl-CoA (5 mM) und Coenzym A (5 mM; CoASH Anteil mit 0,7 skaliert)

Werden diese Differenzspektren (entsprechend skaliert) mit dem Ursprungsspektrum in Gegenwart von Coenzym A verglichen, so lässt sich das rhombische Signal fast völlig auslöschen und ein isotropes Signal erzeugen, welches im Fall von Butyryl-CoA jedoch nicht völlig symmetrisch ist (Spektrum nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass das Spektrum des Semichinonradikals hier von anderen Komponenten überlagert wird, die eventuell Substratradikale darstellen könnten. Im Vergleich dazu zeigt sich bei Crotonyl-CoA ein wesentlich symmetrischeres Signal mit nur sehr geringen Anzeichen einer Überlagerung durch weitere Signale, die ein hypothetisches organisches Radikal repräsentieren könnten. Auffällig ist jedoch ein Signal bei g_1 2,03 (ca. 3325 Gauss), welches nach ansonsten vollständiger Subtraktion des rhombischen Anteils erhalten blieb und bereits in der einfachen Differenz unproportional zum restlichen rhombischen Anteil ist (Abbildung 36 B). Eine Erklärung hierfür bietet die relativ zur Signalbreite höhere Sättigung von scharfen Signalen, welche einen selektiven Verstärkereffekt herfordern könnte. Zusätzlich dazu könnte hier auch eine Subtraktionsartefakt aufgetreten sein. Flavinsignale können bei gleicher Amplitude eine leicht unterschiedliche Signalform aufweisen und so in der Differenz zu einem Skalierungsfehler führen.

Zusammenfassend zeigt ein Vergleich der Signale der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit dem natürlichen Substrat Crotonyl-CoA und dem Analogon Butyryl-CoA, dass eine Verschiebung eines Teils des Spektrums im Bereich von 3350 bis 3450 Gauss stattfindet, die auf ein Substratradikal hindeuten könnte.

3.12 Spezifische Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Inhibitoren

Wird die spezifische Aktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Acetoacetyl-CoA (6), 3-Hydroxybutyryl-CoA (7) oder 4-Hydroxybutan-CoA-Ether (9) zusätzlich zu 4-Hydroxybutyryl-CoA bestimmt (Verhältniss 1 zu 1), so zeigen sich gegenüber der Messung mit reinem 4-Hydroxybutyryl-CoA keine signifikanten inhibitorischen Effekte. Ein weiteres interessantes Substrat für Inhibitorversuche stellt 4-Thiolbutyryl-CoA dar. Hierbei könnte der Unterschied in der Reaktivität sowie in der Stabilität einer Koordinierung mit dem [4Fe-4S]-Cluster zwischen einer Mercapto- einer Hydroxylgruppe Änderungen in der gemessenen Aktivität hervorrufen. Jedoch zeigte die Synthese ausgehend von γ -Thiobutyrolacton und freiem CoASH keine mit MALDI-TOF-MS charakterisierbaren Produkte.

3.13 Versuche zum Nachweis der Migration von Deuterium von C2 in 4-Hydroxybutyryl-CoA zu C4 in Crotonyl-CoA

Ein bisher nicht untersuchter Aspekt im Reaktionsmechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ist die Frage, welche Basen für die Deprotonierung und Reprotonierung des Substrats in Frage kommen. Für die Abstraktion des β -Protons geht aus der Modellierung des Substrats in die Kristallstruktur der Flavinkofaktor als einziger Kandidat hervor. Für die Abstraktion des α -Protons kann aufgrund des Substratbindemodells in der Kristallstruktur (Martins et al. 2004) in Verbindung mit der Stereoselektivität für C2 (Abschnitt 3.1) His292 als Base angenommen werden. Hierbei bleibt die Frage zu klären, ob es sterisch auch die für die Initiation der Rückreaktion erforderliche Deprotonierung der Methylgruppe von Crotonyl-CoA durchführen kann. Sollte dies der Fall sein, so würde die Reprotonierung des planaren Dienolat-Intermediats zu Crotonyl-CoA durch das Proton erfolgen, welches zur Initiation der Katalyse in α -Position von 4-Hydroxybutyryl-CoA abstrahiert wurde. Bei der Verwendung von 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_2$]butyryl-CoA als Substrat müsste sich dies durch eine Verschiebung der Markierung in C2 Position zum C4 von Crotonyl-CoA nachweisen lassen.

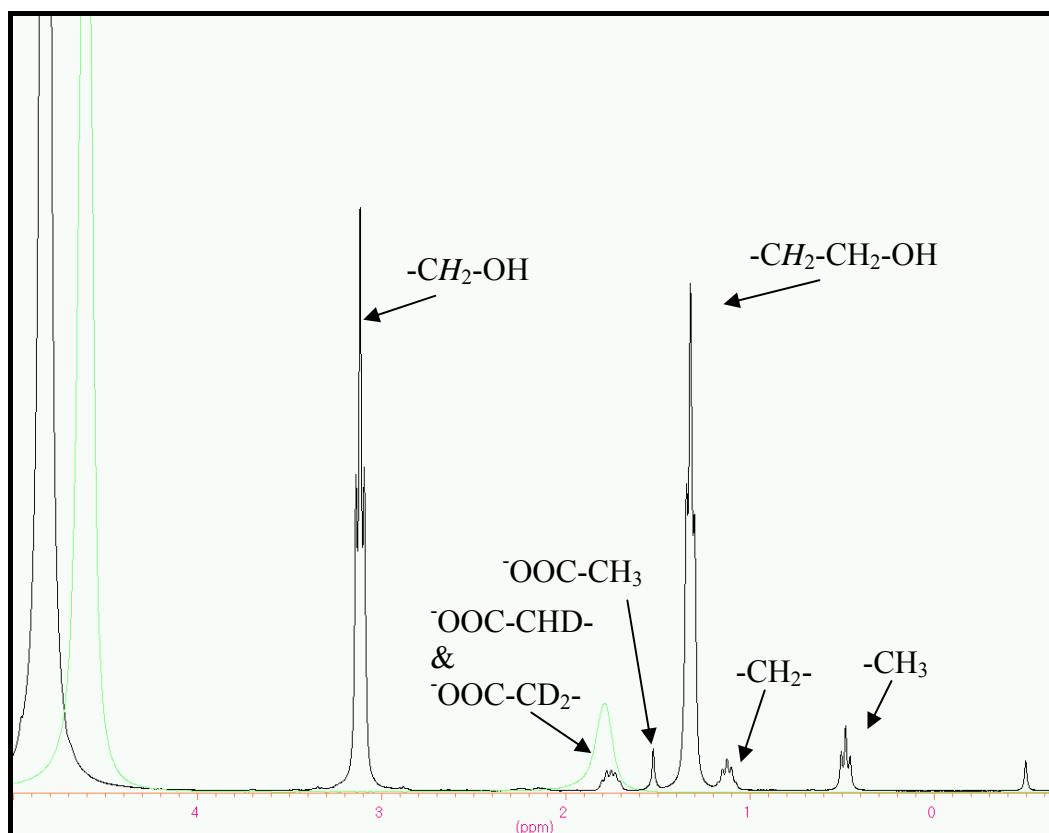


Abbildung 37. Analyse der Deuteriumverteilung der Produkte nach Dampfdestillation: Gezeigt ist die Überlagerung von ^1H -NMR- (schwarz) und ^2H -NMR-Spektren (grün). Es tritt aufgrund des hohen pH-Werts und der hohen Salzkonzentration eine Verschiebung von ca. 0,5 ppm auf, wie am Signal von Tetramethylsilan (- 0,5 ppm) zu erkennen ist.

Ein zentraler Punkt des Experiments ist die Entfernung des Produkts Crotonyl-CoA, da die Reaktion der Dehydratase reversibel ist und nur leicht auf der Seite von Crotonyl-CoA liegt ($k = 0,81$; 45 zu 55) (Friedrich 2003). Die Methylgruppe von Crotonyl-CoA sollte nach einer erfolgten Migration ein Deuterium enthalten, welches zu einer gewissen Wahrscheinlichkeit bei der Rückreaktion wieder verloren gehen würde. Deshalb kann ein Migrationseffekt mit den herkömmlichen Austauschexperimenten (Abschnitte 3.1.1 und 3.1.2) nicht nachgewiesen werden. Ein dort auftretender Migrationseffekt hätte eine Retention der Deuteriummarkierung zur Folge, der in keinem der Fälle beobachtet werden konnte. Auch muss genügend Substrat umgesetzt werden, um die für die Analyse mit NMR erforderlichen Stoffmengen zu erzeugen. Dies wird erreicht, indem die Reaktion der Dehydratase mit einer Butyryl-CoA-Dehydrogenase gekoppelt wird, die Crotonyl-CoA irreversibel aus dem Gleichgewicht entfernt (Abbildung 38). Das daraus entstehende Butyryl-CoA dient wiederum als CoA-Donor für die 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase, welche 4-Hydroxy[2-²H₂]Butyrat in den Kreislauf einführt und dabei das Produkt Butyrat entfernt. Durch Dampfdestillation wird das Produkt aus dem Reaktionsansatz gewonnen.

Die Analyse mit ¹H-NMR ergab das folgende Spektrum des Produktgemisches, das Butyrat, Acetat (hervorgegangen aus dem für den Start der Reaktion erforderlichen 5 µmol Acetyl-CoA) und unverbrauchtes Startmaterial (96,8 % Deuteriumgehalt an C2) zeigt (Abbildung 37): ¹H-NMR (D₂O) δ 3,12 (t, $J = 6,8$, CH₂CH₂O) 1,75 (m, COOCH₂CH₂CH₂OH + COOCDHCH₂CH₂OH + COOCDHCH₂CH₃) 1,52 (s, COOCH₃) 1,32 (t, $J = 6,42$, CH₂CH₂OH) 1,12 (2H, p, $J = 7,08$, CH₂CH₃) 0,48 (3H, t, $J = 7,37$, CH₃). Hierbei fällt eine leichte Verbreiterung sowie eine Verschiebung der Signale von ca. 0,5 ppm bedingt durch den hohen pH-Wert der Probe (pH 12) auf.

Integrale der Produkte werden relativ zum C3 von Buttersäure, welche von einer auftretenden Migration unbeeinflusst wäre, bestimmt. Relativ zu dem auf 2 Protonen festgelegten Integral für C3 ergibt das Integral für C4 also 2,8 Protonen. Das Signal bei 1,52 ppm ist dem aus Acetyl-CoA entstandenen Acetat zuzuordnen und hat ein Integral von 1,05. Dem nicht umgesetzten 4-Hydroxybutyrat entsprechen die Integrale 25,6 (3,12 ppm, CH₂CO) und 25,3 (1,32, CH₂CH₂O), während das Signal, welches die α-Protonen repräsentiert, sich mit dem von Butyrat überlagert. Daraus ergibt sich ein Anteil von 9,4 % Butyrat relativ zu 4-Hydroxybutyrat.

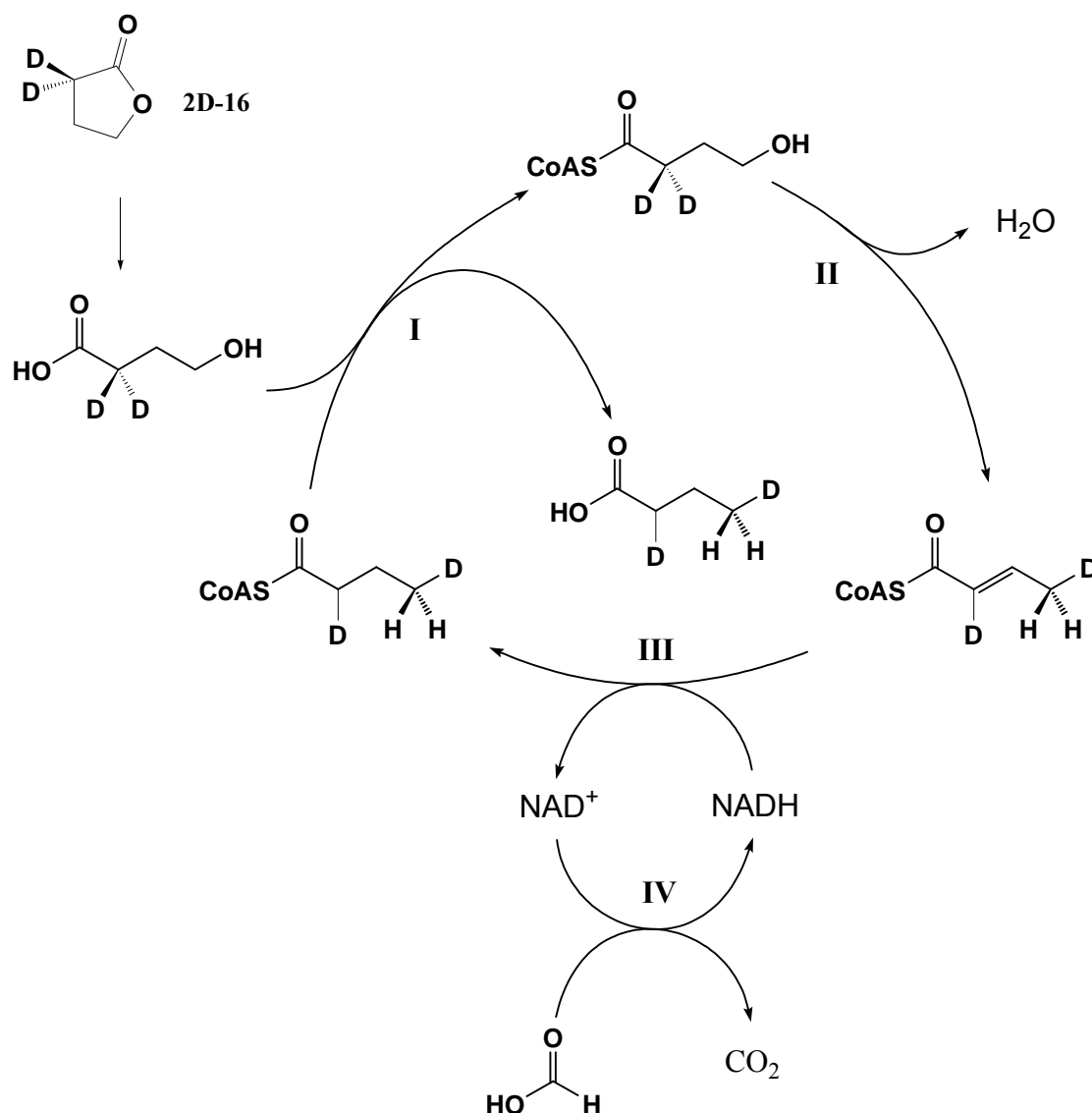


Abbildung 38. Enzymatische Umwandlung von γ -[2- $^2\text{H}_2$]Butyrolacton zu Buttersäure zur Analyse der Migration von C2 zu C4 in der Reaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase: 4-Hydroxybutyryl-CoA-Transferase (I), 0,13 U 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (II), 4,5 U Butyryl-CoA-Dehydrogenase (III), 3,13 U Formiatdehydrogenase (IV)

Um das Integral der α -Protonen beider Stoffe zu vergleichen, wird der Anteil der Protonen im C2 Signal, der von 4-Hydroxybutyrat stammt, ermittelt und von dem Gesamtintegral abgezogen. Durch den Gehalt der Deuteriummarkierung im Ausgangsmaterial γ -[2- $^2\text{H}_2$]Butyrolacton 96,8 % (NMR) und der Integrale bei 3,12 ppm und 1,75 ppm kann der Anteil des 4-Hydroxybutyrats am Signal bei 1,75 ppm auf 0,83 Protonen berechnet werden. Da das Integral des Signals bei 1,75 ppm 1,83 Protonen beträgt, kann nun der Anteil von Butyrat auf 1,0 Protonen bestimmt werden. Somit hat das Produkt Butyrat ein Verhältnis der Protonen von 1 (C2) zu 2 (C3) zu 2,8 (C4). Eine Migration vom C2 zum C4 würde eine

signifikante Reduktion des Integrals am C4 von Butyrat bedeuten. Dies kann aufgrund der Ungenauigkeiten bei der Wahl der Integralgrenzen und der Überlagerung von Signalen mit dem Hintergrund nicht mit Sicherheit festgestellt werden.

Eine unterstützende Untersuchung mit ^2H -NMR ergab nur ein Signal (Abbildung 37, Spektrum in grün), welches mit dem verbliebenen Deuterium im Produkt und dem Deuterium im Ausgangsmaterial korreliert werden kann. Ein Nachweis für die Migration wären Signale, die mit der γ -Gruppe von Butyrat überlagert werden können. Da durch die Rückreaktion der Dehydratase der Deuteriumgehalt einer Markierung am C4 verringert sein könnte, ist nicht auszuschließen, dass eine Migration unterhalb der Nachweisgrenzen dieses Experiments stattgefunden hat. Dies ließe sich durch einen Vergleich des Gehalts an Deuterium für C3 und C4 im Butyrat nachweisen, jedoch müsste dafür die Konzentration der Probe so hoch sein, dass die natürlichen Isotopenanteile von Deuterium im ^2H -NMR ein Signal ergeben.

Das Wachstum von *Clostridium aminobutyricum* auf 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_2$]butyrat erzeugte ebenfalls Butyrat ohne Markierung in C4-Position (Nadine Mühlhäuser und Wolfgang Buckel, unveröffentlichte Daten). Nach den vorliegenden Daten kann daher eine Migration von Protonen während der Dehydratation von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Butyryl-CoA ausgeschlossen werden.

3.14 Succinatsemialdehyd als alternatives Substrat der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase

Als ein Nebeneffekt der Versuche mit Succinatsemialdehyd (4-Oxobutyrat) als Vorstufe zu markiertem 4-Hydroxybutyrat (Abschnitt 3.6, Experiment zur chiralen Methylgruppe) wurde beobachtet, dass 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase in der Lage ist, Succinatsemialdehyd als Substrat zu akzeptieren und mit Acetyl-CoA als Donor auf Coenzym A zu übertragen. Es wurde ein nur in der Gegenwart von Enzym und Acetyl-CoA auftretendes Produkt mit einer Masse von 852 Da gefunden (Abbildung 39). Diese entspricht der Masse, die an freies Coenzym A verestertes 4-Oxobutyrat aufweisen würde.

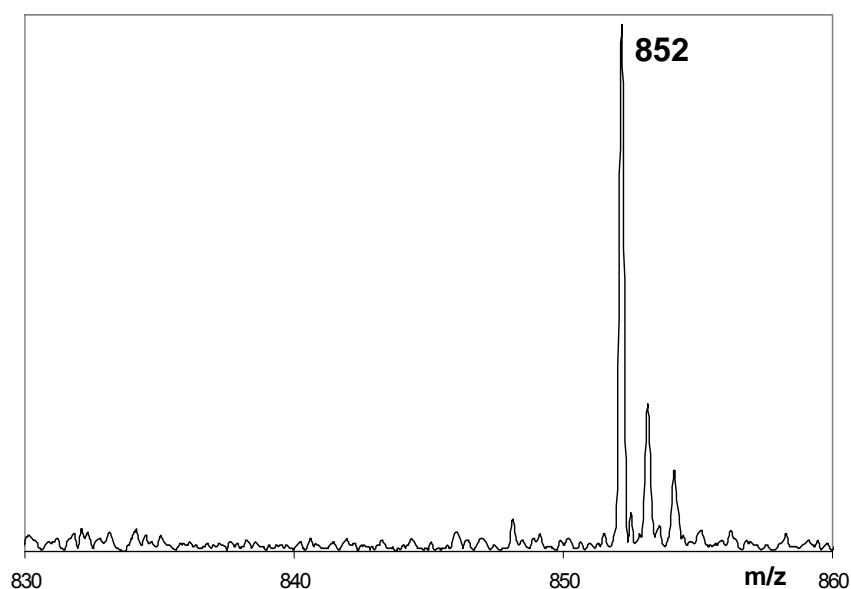


Abbildung 39. 4-Oxobutyryl-CoA ($m/z = 852$ Da). Ergebnis der Inkubation von Acetyl-CoA mit 4-Oxobutyrat und 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase.

4. Diskussion

Die Vorhersagen zum Substratbindemodell der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase konnten erfolgreich bestätigt werden. Nach den Resultaten dieser Arbeit, zusammen mit der Abstraktion des 3*Si*-Wasserstoffs (Scott et al. 2004), kann der stereochemische Verlauf der Reaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase an den Kohlenstoffatomen 2 und 3 als *anti*-Eliminierung beschrieben werden. Zusammen mit der beobachteten Retention der Konfiguration am C4 ist damit die vollständige Stereochemie der Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA aufgeklärt (Abbildung 40). Die Stereoselektivität am C4 kann durch ein planares Dienolat-Intermediat erklärt werden, das durch Substitution der Hydroxylgruppe unter Mithilfe des als Lewis-Säure wirkenden [4Fe-4S]-Clusters entsteht.

Da bisher eine Kokristallisation aufgrund von Substratinstabilität nicht möglich war, bietet die stereoselektive organische Synthese hier das passende Werkzeug zur Aufklärung der Enzym-Substrat Wechselwirkungen und des Bindemodells.

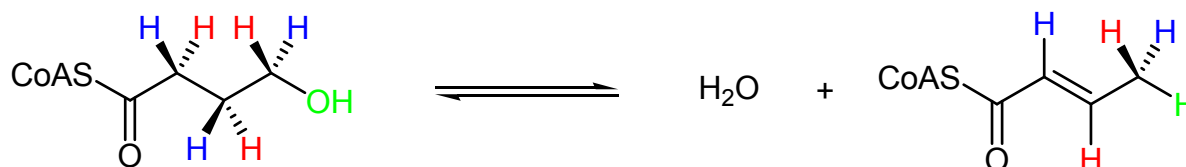


Abbildung 40. Stereochemie der Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA (Friedrich et al. 2008a; Friedrich et al. 2008b)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Aufklärung der Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (*R*)- und (*S*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA sowie (*R*)- und (*S*)-4-Hydroxy[4-³H, 4-²H₁]butyryl-CoA mittels Kombination von stereoselektiver organischer Synthese und enzymatischen Systemen mit mehreren Komponenten hergestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Synthese über Methionin nicht enantiomerenreine Produkte entstehen: (*S*)-Methionin → (*R*)-γ-[2-²H₁]Butyrolacton (91 % rein); (*R*)-Methionin → (*S*)-γ-[2-²H₁]Butyrolacton (83 % rein). Daher wurde eine bessere Alternative über 3-Benzoyloxypropan-1-ol entwickelt, die zu enantiomerenreinen Produkten mit nahezu vollständiger Deuteriummarkierung (> 95 %, NMR) führt. Der flexible Verfahrensaufbau in neun Stufen könnte durch Wiederholung einzelner Schritte neben der Markierung in α-

Position auch eine in β -Position ermöglichen, wobei die Kettenlänge der Carbonsäuren variiert werden kann.

Für die Analyse der Substitution der Hydroxylgruppe durch ein Proton wurden alle drei Wasserstoffisotope verwandt. Ausgehend von Formiat wurde dabei die erste Markierung in 4-Oxo[4- $^2\text{H}_1$]buttersäure bzw. 4-Oxo[4- ^3H]buttersäure eingebracht. Bei der Verwendung des bestehenden Verfahren über γ -Ethoxybutyrolacton (Wermuth 1979; Näser 2004) konnte eine unvollständige Deuteriummarkierung nachgewiesen werden. Der Ringschluss des γ -Ethoxybutyrolactons wurde als Ursache identifiziert und das Verfahren modifiziert, um die Rate der Deuteriummarkierung zu erhöhen.

Für die Einführung der zweiten Markierung durch Reduktion von 4-Oxo[4- $^2\text{H}_1$]buttersäure bzw. 4-Oxo[4- ^3H]buttersäure wurde zuerst Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber genutzt, die *Re*-stereoselektiv ist (Adolph et al. 1991; Adolph et al. 1993). Durch alternative Verwendung von 4-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase aus *Clostridium aminobutyricum* konnte nicht nur die Vollständigkeit der Markierung erhöht, sondern auch gezeigt werden, dass beide Enzyme die gleiche Stereoselektivität aufweisen (Abschnitt 3.6).

Im Folgenden wird die Stereoselektivität und Enantiomerenreinheit der Synthesen ausgehend von 3-Benzoyloxypropan-1-ol und Methionin diskutiert (Abschnitt 4.1). Die Vollständigkeit der Deuteriummarkierung in 4-Oxo[4- $^2\text{H}_1$]buttersäure wird zusammen mit dem Mechanismus der γ -Ethoxybutyrolactonsynthese dargestellt (Abschnitt 4.2). Die Bestätigung des Substratbindemodells durch die Aufklärung der Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase sowie die daraus ableitbaren katalytisch aktiven Elemente (Abschnitt 4.3.1) werden in Zusammenhang mit den spektroskopischen Daten der Substrateffekte (Abschnitt 4.3.2) diskutiert. Daraus können die Vorstellungen über den Reaktionsmechanismus (Abschnitt 4.3.4) und die initiale α -Deprotonierung (Abschnitt 4.3.3) aktualisiert und weiterführende Untersuchung zur Klärung der offenen Fragen vorgeschlagen werden (Abschnitt 4.3.5).

4.1 Stereoselektivität der Substratsynthesen

4.1.1 4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA über 3-Benzylxypropan-1-ol

Die Notwendigkeit der Synthese von enantiomerenreinen Substraten erforderte die Entwicklung eines neuen Verfahrens. Ein erfolgreicher Weg zur Synthese von enantiomerenreinem (*R*)- und (*S*)-4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA wurde ausgehend von 3-Benzylxypropan-1-ol beschritten.

Um eine Markierung in α -Position zu erhalten war der nächste Schritt die stereoselektive Markierung des Alkohols mit Kettenverlängerung über Tosylierung mit anschließender Cyanidkondensation und der Hydrolyse des Nitrils zur Carbonsäure. Eine enantiomerenreine Deuteriummarkierung von (*R*)-2-Benzylxy[1-²H₁]ethanol mittels Alkoholdehydrogenase (ADH) ist ausgehend von dem entsprechenden Aldehyd möglich (Speranza et al. 2003).

Die Wahl des Benzylxyalkohols als Ausgangsmaterial der Synthese legt die Kettenlänge des Endprodukts fest. Für eine Synthese von stereoselektiv markiertem 4-Hydroxy[2-²H₁]butyrat wird daher 3-Benzylxypropan-1-ol verwendet. Hierbei ist die spätere Hydroxylgruppe durch einen Benzylxyether geschützt. Die Größe der aromatischen Schutzgruppe ermöglicht eine sterisch selektive Bindung an chirale Reduktionsmittel.

Bei einer Synthese in mehreren Schritten ist die beliebige Skalierbarkeit der ersten Schritte oft eine Voraussetzung, um genügend Produkt für die späteren Reaktionen zu erhalten. Obwohl 3-Benzylxypropan-1-ol ebenfalls ein Substrat der ADH ist kann aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit des Substrats praktisch keine quantitative Ausbeute erreicht werden. Da mit ADH keine *Si*-stereoselektive Reduktion erfolgen kann, müssten für die Synthese (*S*)-Alkohols die Reaktionsbedingungen und Substrate angepasst werden.

Aufgrund dieser Nachteile wurde die zentrale stereospezifische Reduktion des Aldehyds nicht enzymatisch durchgeführt, sondern chemisch mit ALPINE-BORANETM. Die sterische Hinderung durch die Benzylxyschutzgruppe bewirkt eine stereoselektive Koordinierung an das Boratom von *R*- bzw. *S*-ALPINE-BORANETM (Abbildung 41), welches durch einen am Boratom fixierten Cyclooctanring so abgeschirmt ist, dass der C-H acide Teil des Kampferliganden nur eine Seite des Aldehyds reduzieren kann (Midland et al. 1980; Bauer et al. 1991; Ramachandran et al. 1993).

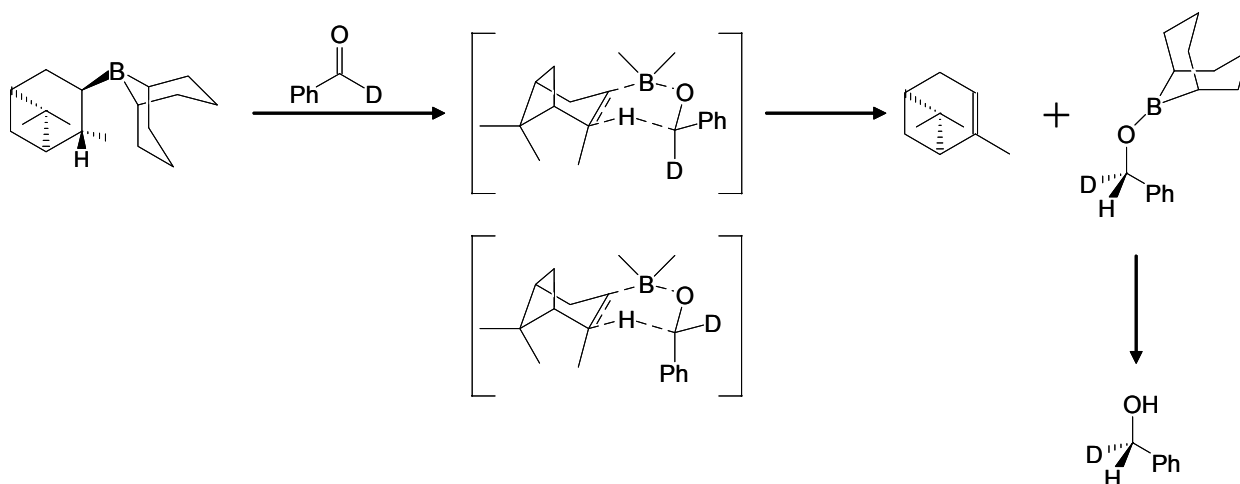


Abbildung 41. Chirale Reduktion von C=O-Gruppen durch ALPINE-BORANETM. Ph: steht hier für eine beliebige Benzolhaltige oder anderweitig sterisch hindernde Schutzgruppe.

Da kommerziell erhältliches ALPINE-BORANETM kein Deuterium enthält, wurde ein bereits deuteriertes Edukt benötigt. 3-Benzzyloxypropan-1-ol wurde zunächst mit Jones Reagenz zur Carbonsäure oxidiert und anschließend über Reduktion durch LiAlD₄ zu 3-Benzzyloxy[1-²H₂]propan-1-ol mit Deuterium markiert. Swern'sche Oxidation zum Aldehyd ermöglichte nun die stereoselektive Reduktion zu 3-Benzzyloxy[1-²H₁]propan-1-ol.

Die Tosylierung des chiralen Alkohols mit anschließender Cyanolyse invertiert die Konfiguration des markierten C-Atoms (Battersby et al. 1979). Als Alternative zur vollständigen Hydrolyse des daraus folgenden Nitrils zur Carbonsäure wurde dieses mit überschüssigem Acetamid unter Palladiumkatalyse (Pd-Acetat) zum Amid überführt (Maffioli et al. 2005). Diese Reaktion hat mehrere Vorteile: Die milden Reaktionsbedingungen (pH neutral, Raumtemperatur) lassen die Konfiguration der Markierung unbeeinflusst und das Produkt ist sehr sauber und gut kristallisierbar. Die Hydrierung des Benzyloxyethers über einen Palladiumkatalysator in Wasserstoff lieferte 4-Hydroxy[2-²H₁]butyrylamid, das zu enantiomerenreinem γ -[2-²H₁]Butyrolacton lactonisiert wurde. Die absolute Konfiguration des Endprodukts wurde nach Oxidation zu [2-²H₁]Bernsteinsäure mit CD-Spektroskopie durch Vergleich der molaren Eliliptizitäten mit der Literatur bestätigt (Listowsky et al. 1970; Hartrampf und Buckel 1986) (Abschnitt 3.5). Die Enantiomerenreinheit konnte insbesondere durch die folgenden Experimente zur Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.1). Eine für 2-Benzzyloxyethanol erfolgreich angewendete Methode zur Bestimmung des Isomerenverhältnisses mit Mosher-Säure-Estern des chiralen Alkohols (Speranza et al. 2003) zeigte keine Auswertbaren NMR-Spektren.

Bei den für das Einführen der Markierung verantwortlichen Schritten und allen Folgenden treten keine störenden intramolekularen Stabilisierungen auf, die Enantioselektivität beeinflussen. Beim Entwurf des Verfahrens wurde darauf geachtet, dass in allen für die Markierung relevanten Schritten die Wahrscheinlichkeit eines Protonenaustauschs minimiert wird. Dies wurde durch wasserfrei Umgebungen bzw. das Vermeiden von extremen pH-Werten erreicht. Dennoch konnte keine vollständige Deuteriummarkierung erreicht werden (MALDI-TOF-MS < 10 % unmarkiert, NMR > 95 % vollständig), was auf das für die Reduktion der Carboxylgruppe verwendete LiAlD₄ (96 % Deuteriumgehalt) zurückgeführt werden konnte.

Die Kettenlänge von in α -Position stereoselektiv markierten Substraten kann durch entsprechende Ausgangssubstanzen gewählt werden (z.B. 4-Benzyloxybutan-1-ol für 5-Hydroxypentansäure). Eine weitere Variation der Kettenlänge könnte die Synthese von in β -Position markierten Produkten erlauben, indem das Amid erneut zum Alkohol reduziert wird, der danach für einen weiteren Tosylierungsschritt mit Cyanidkondensation zur Verfügung stünde. Soll außerdem noch eine weitere stereoselektive Markierung eingefügt werden, so muss der Alkohol zunächst erneut zur Carbonsäure oxidiert werden, um danach wie oben beschrieben schrittweise stereoselektiv zum Alkohol reduziert zu werden. Dieser könnte bei Bedarf erneut kettenverlängert werden. Beispielsweise könnte ausgehend von Benzyloxethanol die Synthese von γ -[2-²H₁, 3-²H₁]Butyrolacton erfolgen. Mit jeder Kettenverlängerung und weiteren Markierung sinkt jedoch die Gesamtausbeute.

4.1.2 4-Hydroxy[2-²H₁]butyryl-CoA über Methionin

Die stereoselektive Substitution mittels Nitrierung aktivierter α -Aminosäuren durch Halogene wurde bereits gut beschrieben (Brewster et al. 1950; Austin und Howard 1961; Mori et al. 1979; Hirth und Walther 1985). Sie läuft über Retention der Konfiguration am C2 ab und bietet durch anschließende Reduktion mit Triethylbordeuterid (SuperdeutridTM, Sigma-Aldrich) eine Methode zur stereoselektiven Deuterierung von Carbonsäuren in α -Position, die in relativ wenigen Syntheseschritten realisiert werden kann.

Als Ausgangsmaterial zur Synthese von 4-Hydroxy[2-²H₁]butyrat wurden (*R*)- und (*S*)-Methionin gewählt, da sie bereits das richtige Grundgerüst von vier Kohlenstoffatomen aufweisen. Es wurde angenommen, dass die Stereokonfiguration der Ausgangsaminosäure während der Halogenierung erhalten bleibt. Dabei wird die durch Diazotierung aktivierte

Aminogruppe durch nukleophilen Angriff der in einen intramolekularen Dreiring mit dem Sauerstoff der Carboxylgruppe überführt, der durch einen weiteren nukleophilen Angriff durch Bromid wieder aufgelöst wird (zweifache S_N2, doppelte Inversion). Das aktivierte Ausgangssubstrat würde demnach zu 2-Bromo-4-methylthiobuttersäure unter Erhaltung der Stereokonfiguration am C2 nukleophil substituiert.

Im zweiten Schritt wurde zunächst angenommen, dass keine intramolekularen Stabilisierungen stattfinden und somit die reduktive Substitution von Brom durch Triethylbordeuterid unter WALDEN-Inversion (S_N2) der Stereokonfiguration verlaufen sollte. Schützen der Carboxylgruppe durch Verestern mit Methanol und anschließende Alkylierung der Thiomethylgruppe mit Iodomethan ermöglichen nun die basische Hydrolyse zu 4-Hydroxy[2-²H₁]butyrat, welches für eine Extraktion in Dichlormethan lactonisiert wird.

Aufgrund der relativ einfachen Umsetzbarkeit wurde diese Syntheseroute zunächst für die Substratherstellung für Untersuchungen über die Stereoselektivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase genutzt. Dieser Weg führte jedoch nicht zu enantiomerenreinen Substraten (ausgehend von (*R*)-Methionin: 90 %; ausgehend von (*S*)-Methionin 80 %), so dass die zweite Synthese über 3-Benzoyloxypropan-1-ol (Abschnitte 4.1.1, 3.1.1 und 2.20.2) entwickelt wurde.

Eine enzymatische Chiralitätsbestimmung der aus Methionin synthetisierten Lactone wäre mit Crotonase möglich, die *Si*-Stereoselektivität für den Austausch des α-Protons von Butyryl-CoA mit dem Lösungsmittel hat (D'Ordine et al. 1994). Dies erforderte eine abgewandelte Synthese direkt nach der Einführung der Markierung in 4-Methylthio[2-²H₁]buttersäure, der die Methyl-Thio-Gruppe durch Raney-Nickel-Katalysator entfernt wurde. Obwohl der Deuteriumgehalt dabei konstant blieb (¹H-NMR (H₂O) δ 2,01 (1H, m, CDH); Fehler 5% / MALDI-TOF-MS von Butyryl-CoA: 5 % 839 Da, 95 % 839 Da), zeigte die anschließende Analyse ein komplettes Racemat (Abschnitt 3.1.2, Abbildung 11). Dies könnte auf die Reaktion mit dem Raney-Nickel-Katalysator zurückgeführt werden, allerdings wurde die Racemisierung einer Deuteriummarkierung ohne Austausch mit Wasser für diesen Katalysator bisher nicht beschrieben.

Deswegen wurde eine Bestimmung der Enantiomerenreinheit der (*R*)- und (*S*)-γ-[2-²H₁]butyrolactone mit NMR-Spektroskopie und chiralen Shift-Reagenzien durchgeführt. Theoretisch könnte so deren Isomergehalt separat durch Integration der Signale jedes

Isomers bestimmt werden. Es konnte zwar bestätigt werden, dass die Synthese stereoselektiv verläuft, jedoch die Enantiomerenreinheit und absolute Konfiguration nicht ermittelt werden (Abschnitt 3.4). Deshalb wurden diese über CD-Spektroskopie mit enantiomerenreiner aus 3-Benzoyloxypropan-1-ol hervorgegangener $[2\text{-}^2\text{H}_1]$ Bernsteinsäure als Referenz bestimmt. Für $[2\text{-}^2\text{H}_1]$ Bernsteinsäure ausgehend von (*S*)-Methionin ergab sich eine Reinheit von 91 %, während ausgehend von (*R*)-Methionin 83 % erreicht wurden. Die Diskrepanz zu den Untersuchungen mit MALDI-TOF-MS ist über die relativ ungenaue Integration sich überlagernder Signale in den Spektren zu erklären. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration der Endprodukte für die Synthese ausgehend von Methionin zeigt insgesamt eine Inversion der Konfiguration (Tabelle 2, Abschnitt 3.5: (*S*)-Methionin \rightarrow (*R*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]$ Butyrolacton; (*R*)-Methionin \rightarrow (*S*)- $[2\text{-}^2\text{H}_1]$ Butyrolacton).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Substitution der Aminogruppe von α -Aminosäuren durch Halogene in einigen Fällen nur zu ca. 90 % enantiomerenreinen Produkten führt (Shimohigashi et al. 1979; Koppenhofer et al. 1982; Schurig et al. 1986). Wird die Carboxylgruppe vor der Substitution verestert, so verläuft diese tendenziell unter Inversion aber hohem Anteil des jeweils anderen Stereoisomers (Brewster et al. 1950). Dies weist auf die intramolekulare Stabilisierung als ein notwendiges Element für die Stereoselektivität der Reaktion hin. In Methionin stellt die Intramolekulare Stabilisierung durch Schwefel eine Alternative zu der durch Sauerstoff dar. Schwefel kann in höhere Valenzstadien übergehen und so positive Ladungen gut stabilisieren. Die Bildung eines Thiobutanrings oder α -Lacton-Intermediats nach der Abspaltung der Aminogruppe kommen hier theoretisch in Frage (Abbildung 42).

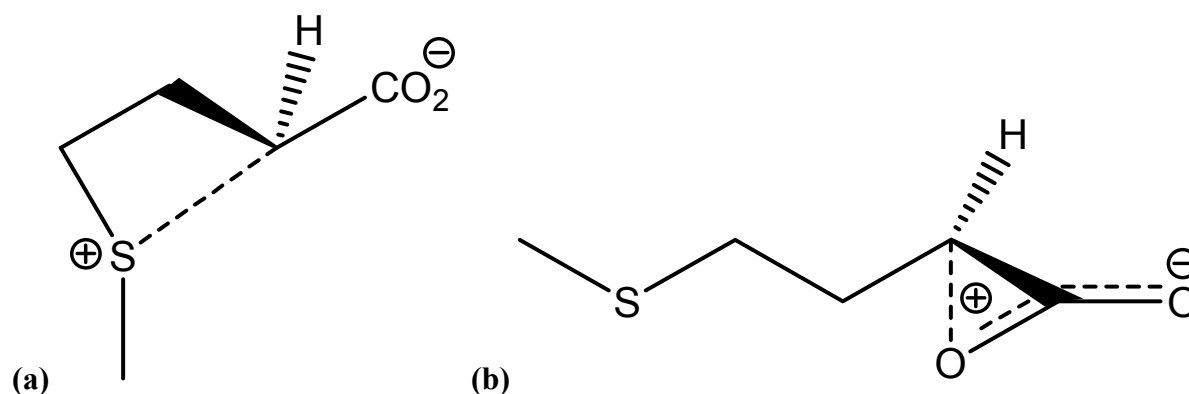


Abbildung 42. Zwei Möglichkeiten zur Stabilisierung des Übergangszustands bei Retention der Konfiguration: (a) Thiobutanring, (b) α -Lacton-Intermediat

Somit sind für die α -Halogensubstitution mehrere konkurrierende Reaktionssequenzen denkbar: Durch S_N2 könnte entweder ein intramolekularer Ring mit dem Schwefel (Abbildung 42 A) oder dem Carbonylsauerstoff (Abbildung 42 B) gebildet werden. Diese sind jedoch theoretisch durch nukleophile Angriffe ineinander überführbar. Dabei würde die Konfiguration des Ringsystems umgekehrt. Jedes Intermediat kann durch nukleophilen Angriff von Bromid zum Produkt hin aufgelöst werden. Je nachdem ob der intramolekulare Ring direkt zum Produkt weiterreagiert (Retention der Konfiguration), in den anderen Ring übergeht (Inversion der Konfiguration) oder ohne intramolekulare Stabilisierung direkt von Bromid substituiert wird (Inversion der Konfiguration), würde sich eine nicht enantiomerenreine 2-Bromo-4-methylthiobuttersäure ergeben.

Die anschließende reduktive Eliminierung des Broms könnte ebenfalls durch intramolekulare Ringsysteme stabilisiert werden. In vergleichbaren Synthesen läuft diese Reaktion wie erwartet mit Inversion der Konfiguration ab, wobei sowohl die Carboxylgruppe verestert (Yoshikawa et al. 1999), als auch zusätzlich eine Ethergruppe benachbart sein kann (Jacobs und Staunton 1995). Steht das Brom in α -Position zu einer freien Säure läuft die Reaktion ebenfalls über Inversion ab (Leeper et al. 1994). Jedoch wurde auch eine Retention der Konfiguration bei geschützter Carboxylgruppe und der Anwesenheit eines Ethers in Nachbarschaft berichtet (Armarego et al. 1976).

An welcher Stelle die Verringerung an Stereoselektivität genau eintritt, kann aufgrund der experimentellen Daten nicht festgestellt werden. Bei einer Verwendung von Aminosäuren ohne intramolekulare Koordinationspartner, außer der Carboxylgruppe (z.B. Leucin), sollten entsprechend enantiomerenreinere Produkte auftreten. Eine Pilotsynthese, ausgehend von Serin, könnte diese Fragestellung klären und Schwefel als Faktor ausschließen. Hier stünde nur Sauerstoff für ein intramolekulares Ringsystem zur Verfügung.

Bei der Verwendung von Homoserin könnte sogar ein komplettes Racemat auftreten. Dies wäre durch die Möglichkeit einer Lactonbildung erklärbar, indem die nitrierte Aminosäure ohne die stabilisierende Wirkung der Carboxylgruppe über eine S_N1 -Reaktion substituiert würde.

4.2 Mechanismus der Synthese von γ -Ethoxybutyrolacton

Bei der Synthese von deuteriertem γ -Ethoxybutyrolacton fiel auf, dass mit der vorliegenden Methode keine vollständige (im Rahmen der Reinheit des verfügbaren [^2H]Ethylformiats) Markierung zu erreichen war. Da die komplette Synthese bis auf einen Schritt in organischer Umgebung durchgeführt wurde, wird angenommen, dass nach der Entschützung des Diethyl[$^2\text{H}_1$]formylsuccinats (**28a**) zur Dicarbonsäure die Säureprotonen beim Ringschluss zu γ -Ethoxy[4- ^2H]butyrolacton (**29a**) teilweise mit der Markierung am C4 austauschen.

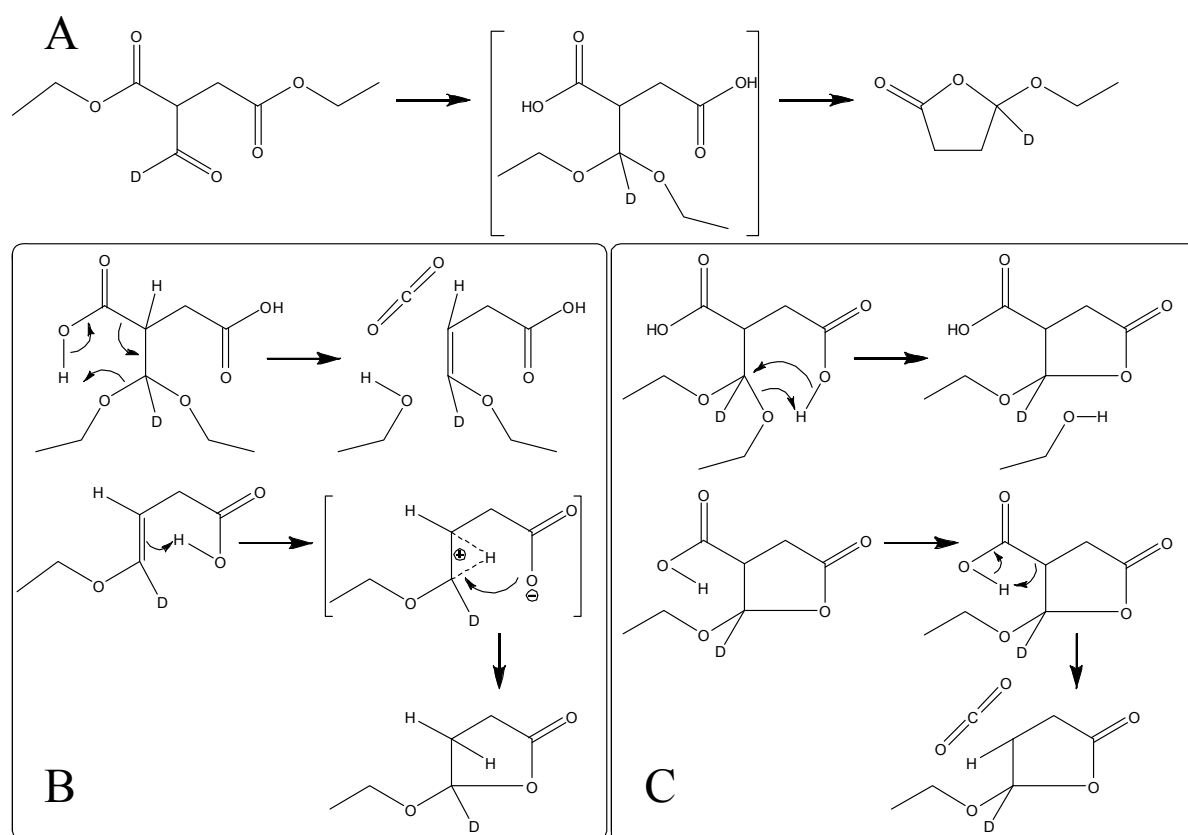


Abbildung 43. **A:** Reaktionssequenzen für die Umwandlung von Diethylformylsuccinat zu γ -Ethoxybutyrolacton über ein Diethylacetal und eine Dicarbonsäure. **B:** Decarboxylierung vor Ringschluss und Ethanoleliminierung. **C:** Ringschluss und Ethanoleliminierung vor Ringschluss.

Hierbei sind unterschiedliche Mechanismen denkbar. Jeweils zeitgleich mit der Eliminierung von Ethanol erfolgt entweder eine Decarboxylierung (Abbildung 43 B) oder ein Ringschluss (Abbildung 43 C). Werden die Protonen der freien Säure vor der Destillation mit D_2O ausgetauscht, ergibt die Analyse der Endprodukte mit ^1H -NMR und ^2H -NMR eine Deuteriuminkorporation in die C2-, C3- und C4-Positionen. Dies zeigt, dass ein Austausch auch an der für die weitere Untersuchung der Stereoselektivität der Dehydratase wichtigen C4

Position stattfindet. Die α -Protonen sind durch die Nachbarschaft zur Carboxylgruppe aktiviert womit eine Markierung an C2 erklärbar ist. Sollte zuerst die Ethanolentfernung und der Ringschluss stattfinden (Abbildung 43 C), so könnte bei der anschließenden Decarboxylierung das Säureproton auf C3 übertragen werden. Würde jedoch bei der Decarboxylierung gleichzeitig die Ethanolabspaltung erfolgen und ein ungesättigtes Intermediat entstehen, so könnte bei dem folgenden Ringschluss das freie Säureproton auf C4 (und in geringerem Maße auf C3) übertragen werden (Abbildung 43 B). Es wäre jedoch auch ein radikalischer Mechanismus bei homolytischer Spaltung der C-C Bindung während der Decarboxylierung denkbar. Auch in diesem Fall müsste eine Markierung an C3 und C4 zu finden sein.

4.3 Stereoselektivität und Überlegungen zum Mechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

4.3.1 Substratbindemodell der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und katalytisch aktive Elemente

Die Röntgenstrukturanalyse von Enzymkristallen bietet einen Zugang zur Analyse von Reaktionsmechanismen. Die Lage des Substrats im Kristall bestimmt, welche Kofaktoren und Aminosäurereste an der Katalyse beteiligt sein können. Im Fall der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ist das Substrat zu instabil, um unter den Bedingungen der Kristallisation einen Kokristall zu bilden. Die Kristallstruktur der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase (Martins et al. 2004) weist jedoch große strukturelle Ähnlichkeiten mit der der Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase aus Schwein (*Sus scrofa*) auf (Kim und Wu 1988; Kim et al. 1993), so dass hiervon ein Substratbindemodell abgeleitet werden konnte.

Wasserstoffbrückenbindungen des Thioestercarbonylsauerstoffs mit der 2'-Hydroxylgruppe des Flavins und der NH-Gruppe von Ala460 bilden dabei die Grundlage für die Verringerung des pK-Werts der α -Protonen des Substrats von ca. pK 21 auf ca. pK 8 und fixieren es damit (Amyes und Richard 1992; Engst et al. 1999; Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b; Ghisla und Thorpe 2004). Weiterhin zeigt die Kristallstruktur der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase, dass der [4Fe-4S]-Cluster asymmetrisch koordiniert wird. Drei Cysteine und ein Histidin in einem ungewöhnlichen Bindemotiv (CX3CX179–183HX6C) fixieren den [4Fe-4S]-Cluster am Ende eines engen Substratbindekanals. Im aktiven Zentrum liegt das vom Histidin koordinierte Eisen auf der *Re*-Seite 7 Å vom N5-Stickstoff des Isoalloxazin-Rings des Flavins entfernt. Die Modellierung des CoA-Ester-Substrats hierzwischen erlaubt eine mögliche zweite Fixierung des Acyl-Rests durch Koordinierung der Hydroxylgruppe mit dem [4Fe-4S]-Cluster, dessen exponierter Eisenkern im Modell von dieser ca. 2,7 Å entfernt liegt (Martins et al. 2004).

Die Reaktion von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA bewirkt keine Netto-Redoxänderung des Substrats. Der Cluster weist ein extrem niedriges Redoxpotential auf (-600 mV; ca. 100 mV geringer als die [4Fe-4S]-Zentren der meisten bakteriellen Ferredoxine). Es konnte kein Elektronentransfer zwischen dem Cluster und dem Flavinsemichinon nachgewiesen werden. Deshalb wurde eine aktive Rolle des Clusters im

Elektronentransport während der Katalyse ausgeschlossen (Müh et al. 1996; Buckel und Golding 1999).

Da bereits beschrieben wurde, dass die Funktionen von Fe-S-Clustern nicht auf Elektronentransport beschränkt sein müssen (Switzer 1989; Johnson 1998), wurde auch im Fall der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach anderen Aufgaben gesucht. Eine rein strukturelle Funktion eines $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters wurde für die Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase aus *Bacillus subtilis* vorgeschlagen (Vollmer et al. 1983; Grandoni et al. 1989).

Ein Hinweis auf direkte Substratinteraktion des Clusters der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bietet der Anstieg des Redoxpotentials um ca. 200 mV bei Substratgabe (Çinkaya 2002). Beispiele für eine direkte Substratinteraktion sind die Dihydroxy-Säuren-Dehydratasen aus Spinat (*Spinacia oleracea*, $[2\text{Fe-2S}]$ -Cluster) (Flint und Emptage 1988) oder *Escherichia coli* ($[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster) (Flint 1993) oder die gut untersuchte Aconitase, für die gezeigt wurde, dass ihr $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster in der Dehydratisierung von Citrat und (2*R*,3*S*)-Isocitrat für die Aktivierung der Hydroxylgruppe die Rolle einer Lewis-Säure übernimmt (Beinert und Kennedy 1989; Beinert et al. 1996). Hier erlaubt die Koordination des Clusters mit drei Cysteinresten dem exponierten Eisen eine koordinative Bindung mit dem Sauerstoff der Hydroxylgruppe des Substrats (Emptage et al. 1983b; Robbins und Stout 1989). Beschrieben wurde dies außer für Aconitase auch für Fumarase (Flint et al. 1992), die die Dehydratisierung von Malat katalysiert.

Analog zur Aktivierung in der Aconitase wurde für den $[4\text{-Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase die Koordination der Hydroxylgruppe des Substrats vorgeschlagen (Müh et al. 1996). Dieser Zusammenhang konnte in dieser Arbeit durch Mössbauerspektroskopie erstmals hergestellt werden (Abschnitt 3.7). Das ohne Substrat aufgenommene asymmetrische Mössbauerspektrum des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters kann als Summe zweier Subspektren dargestellt werden. Dabei können 25 % der Eisenkerne einem Subspektrum zugeordnet werden. Die Messungen bei Substratsättigung zeigen eine Verschiebung dieses Anteils und weisen somit auf eine Änderung in der elektrischen Umgebung eines einzelnen Eisenkerns und damit auf eine mögliche Änderung in dessen Koordinierung hin (Abbildung 23, Abschnitt 3.7).

In Frage kommt der am Boden der Substratbindetasche dem aktiven Zentrum zugewandte zuvor von His292 koordinierte Eisenkern. In früheren Untersuchungen mittels Mössbauer-Spektroskopie wurde für alle Eisenkerne des Clusters eine identische Koordinierung beobachtet, die sich bei Substratgabe (Crotonyl-CoA 6 mM) nicht änderte (Müh et al. 1997).

Hier könnte eine mögliche Kontamination mit Substrat (in der Kontrolle ohne Substrat) eine Verfälschung des Spektrums hervorgerufen haben. Obwohl ENDOR-Untersuchungen mit 4-Hydroxy[4- ^{13}C]butyryl-CoA keine signifikante Interaktion mit dem Cluster zeigen konnten (Abschnitt 3.8), ist die Tatsache, dass die Reaktion der Dehydratase am C4 stereospezifisch verläuft (Abschnitt 3.6), ein Hinweis für die Koordination der Hydroxylgruppe (Friedrich et al. 2008a; Friedrich et al. 2008b). Ohne Einschränkung der freien Drehbarkeit könnte die Stereoselektivität der Reaktion nicht erklärt werden, da nach der Abstraktion der Hydroxylgruppe das Substrat nur noch am Thioestercarbonyl fixiert wäre. Ein planares Dienolatintermediat (siehe unten) während der Dehydratasereaktion, welches auch für die Isomerisierung zu von Vinylacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA angenommen wird, würde die selektive Protonierung zu Crotonyl-CoA ermöglichen.

Als weiterer möglicher Interaktionspartner der Hydroxylgruppe kommt außer dem exponierten Fe1 des Clusters noch Wasser in Frage, welches nach Substratbindung diese durch ein Netzwerk von H-Brückenbindungen stabilisieren könnte. Somit ist davon auszugehen, dass das Substrat vor der Wassereliminierung an mindestens zwei Punkten im aktiven Zentrum fixiert ist.

Die Koordination des His292 mit dem Fe1 des Clusters weist nicht nur auf eine Modulation der elektrischen Umgebung und der Bindungseigenschaften des Fe1 hin, sondern könnte auch die Verfügbarkeit des Histidins als Base während der Katalyse kontrollieren. Ein 3Cys-1His Cluster, indem N ϵ 2-His mit Fe1 des Clusters koordiniert, ist bisher nur für die [FeFe]Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* (Peters et al. 1998), das Hybrid-Cluster-Protein (Cooper et al. 2000) und die nickelhaltigen Kohlenmonoxyd-Dehydrogenasen (Dobbek et al. 2001; Drennan et al. 2001; Doukov et al. 2002; Darnault et al. 2003) beschrieben worden. Für diese Proteine wurden Bindungslängen von 1,9 bis 2,1 Å gezeigt. Im Fall der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ging aus der Kristallstruktur ein für eine Bindung ungewöhnlich großer Abstand des His292 zum Fe1 von 2,4 Å hervor. Dies könnte durch Überlagerung von koordinierten und ungebundenen Zuständen in der Kristallstruktur erklärt werden (Holger Dobbek, Universität Bayreuth, persönliche Mitteilung). Zusammen mit den geänderten elektrischen Bedingungen im Cluster bei Substratbindung ist vorstellbar, dass die Verfügbarkeit des Histidins als Base mit Substratbindung zunimmt, indem Fe1 statistisch häufiger an die Hydroxylgruppe als an N ϵ 2 des His292 gebunden ist.

Diese Überlegung ist konsistent mit der fehlenden Migration eines Deuteriums von C2 zu C4 bei der Dehydratisierung von 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_2$]butyryl-CoA (Abschnitt 3.13). Jedoch ist

hierbei zu beachten, dass im vorgeschlagenen Substratbindemodell His292 vom Lösungsmittel abgeschirmt wäre [(Martins et al. 2004); Berta Martins, Universität Bayreuth, persönliche Mitteilung]. Es wäre laut Modell nur 3.0 Å von C2 und C4 entfernt und dennoch auf De- und Reprotonierungen der C2 Position beschränkt, ohne Protonen mit anderen Basen während des Katalysezyklus auszutauschen.

Es wurde für andere Metalloenzyme beschrieben, dass eine Koordinierung mit dem Nε2-Atom des Histidins die Redox Eigenschaften des koordinierten Eisens modulieren kann [(Martins et al. 2004) und darin enthaltene Referenzen]. Nun kann auch die Erhöhung des Redoxpotentials des Clusters bei Substratbindung um 200 mV erklärt werden (Çinkaya 2002), indem eine Koordinationsänderung am Eisen erfolgt und der Hydroxylsauerstoff das Nε2-Atom des His292 aus der Koordination verdrängt. Jedoch könnte auch die Protonierung des His292-Liganden selbst zu dieser Verschiebung beitragen (Martins et al. 2004)[Imidazolat Zustand des His292 (Holm et al. 1996)]. Wird der Ladungsbeitrag eines Liganden zum Cluster verringert, so sinkt die Kovalenz der Fe-S-Bindung. Die geänderte Elektronendichte am Cluster bewirkt eine höhere effektive Nuklearladung am Eisen, welches dadurch leichter reduzierbar wird (Erhöhung des Redoxpotentials) (Anxolabéhère-Mallart et al. 2001).

Die Resultate der vorliegenden Arbeit verdeutlichen die bereits angenommene Funktion des Clusters als Lewis-Säure und weisen ihm eine Schlüsselrolle in der Stereoselektivität der γ -Eliminierung der Hydroxylgruppe zu. Der Cluster könnte die Verfügbarkeit von His292 modulieren, jedoch wäre auch der umgekehrte Fall denkbar indem die Protonierung des His292-Liganden das Vermögen des Clusters als Lewis-Säure zu fungieren moduliert.

Die Orientierung der α - und β -Wasserstoffatome von 4-Hydroxybutyryl-CoA ist durch das Substratbindemodell festgelegt. Das 2*Re*-Proton deutet dabei auf die Base His292, die im Modell ca. 3 Å von C2 entfernt ist. Das 3*Si*-Proton zeigt auf das für dessen Abstraktion in Frage kommende N5 des FAD-Kofaktors, welches im Modell ca. 3 Å von C3 entfernt liegt (Martins et al. 2004). Die stereoselektive Entfernung dieser Protonen während der Dehydratisierung von 4-Hydroxybutyryl-CoA zu Crotonyl-CoA bestätigt das Substratbindemodell (Friedrich 2003; Scott et al. 2004; Friedrich et al. 2008a). Dies zeigt dass synthetische organische Chemie eine gute Ergänzung zur Röntgenstrukturanalyse darstellt, wenn beispielsweise durch Substratinstabilität keine Kokristallisation möglich ist.

Aus dem Substratbindemodell können die für die De und Reprotonierung der α -, β - und γ -Positionen möglichen Basen abgeleitet werden. Die Rolle von His292 für die α -Position wurde bereits diskutiert. Das N5 des FAD würde die β -Position des Substrats deprotonieren.

Ob dabei das aufgenommene Proton direkt bei der Abstraktion der Hydroxylgruppe auf das gebildete Wasser übertragen wird, ob ein Protonenaustausch über eine weitere Base geschieht oder ob erst nachdem das Substrat dissoziiert wurde, alle Basen wieder in den Ursprungszustand versetzt werden, ist nicht geklärt. Aufgrund der Stereoselektivität der Protonierung von C4 kommen nur Basen in Frage, welche auf derselben Seite des planaren Dienolat-Intermediats liegen, von der die Hydroxylgruppe entfernt wurde. Glu455, eine in den Butyryl-CoA-Dehydrogenasen konservierte Aminosäure, liegt 3,2 Å entfernt von C4 sterisch auf derselben Seite des postulierten planaren Dienolatintermediats und interagiert mit Lys300 und Tyr-296, die Teil der den Cluster koordinierenden Helix sind. Sie stünde damit für die Protonierung des Dienolats zur Verfügung und könnte ebenfalls die Initiation der Rückreaktion durch Deprotonierung der Methylgruppe von Crotonyl-CoA bewirken.

Die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase katalysiert zusätzlich die Δ^2, Δ^3 -Isomerisierung von Vinylacetyl-CoA zu Crotonyl-CoA (Abbildung 2) (Scherf und Buckel 1993). Zur Stereoselektivität der Isomerasereaktion wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt. Bei einer ähnlich angenommenen Lage des Substrats kommen für die α -Position auch Basen auf der *Si*-Seite des Substrats in Frage. Glu257 liegt im Modell 5,2 Å weit entfernt auf der *Si*-Seite des FAD und damit nicht mehr in Reichweite der Substratbindetasche. Glu455 liegt genau wie His 292 nur 3 Å entfernt von C2 auf der *Re*-Seite des Substrats (Martins et al. 2004). Daher wäre für diese Reaktion 2*Re*-Stereoselektivität zu erwarten.

Für die C4 Position wären Untersuchungen zur Stereoselektivität mit $[4\text{-}^3\text{H}, ^2\text{H}_1]\text{Vinylacetyl-CoA}$ analog zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten über chirale Essigsäure möglich. Da ohne die Koordination mittels Hydroxylgruppe die Bindung von Vinylacetyl-CoA im aktiven Zentrum leicht verschoben sein kann und nicht feststeht ob Glu455 die in γ -Position protonierende Base ist, ob sich die Ergebnisse der Untersuchungen mit 4-Hydroxy $[4\text{-}^2\text{H}_1, ^3\text{H}]\text{butyryl-CoA}$ hierauf übertragen lassen.

Der Vergleich zu Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase aus Schwein (*Sus scrofa*) zeigt eine übereinstimmende Stereoselektivität für die 2*Re* und 3*Re* Wasserstoffatome des Substrats (Biellmann und Hirth 1970a; Biellmann und Hirth 1970b; La Roche et al. 1971; Kawaguchi et al. 1980). Hierbei sei angemerkt, dass das 3*Si*-Wasserstoffatom in 4-Hydroxybutyryl-CoA dem 3*Re*-Wasserstoffatom in Butyryl-CoA entspricht. Die Aufklärung der Kristallstrukturen beider Enzyme zeigen, dass die α - und β -Wasserstoffatome die für eine antiperiplanare Reaktion benötigten Positionen einnehmen (Kim et al. 1993; Martins et al. 2004).

4.3.2 Spektroskopische Untersuchungen mit verschiedenen Substraten

Spektroskopische Untersuchungen der Interaktionen des Flavinkofaktors mit verschiedenen Substraten zeigen bei 430 nm den Übergang vom Benzo- zum Semichinonzustand und im Bereich von 500 bis 800 nm „charge-transfer“-Phänomene an. Die Geschwindigkeit der graduellen Reduktion des Benzochinons zum Semichinon ist dabei abhängig vom verwendeten Substrat (Abschnitt 3.10). Crotonyl-CoA bewirkt eine sofortige Einstellung eines Gleichgewichts der Flavinzustände, während Butyryl-CoA genauso wie freies Coenzym A eine langsame Umwandlung zur Folge hat. Butyryl-CoA zeigt jedoch einen dem natürlichen Substrat ähnlichen „charge-transfer“ der auf einen raschen Ladungstransfer am Flavin hindeutet (Abbildung 33). Es wurden bereits Stop-Flow-Studien mit Crotonyl-CoA durchgeführt, die einen Übergang zum Semichinonzustand und den Aufbau einer „charge-transfer“-Bande nach 5 bis 10 ms zeigen (Çinkaya 2002). Hierbei konnte eine biphasische Kurve beobachtet werden, woraus zwei Reaktionskinetiken abgeleitet wurden, wobei die eine mit ca. 400 s^{-1} sehr schnell und die andere mit ca. $1,6 - 4,1\text{ s}^{-1}$ sehr langsam war. Die schnelle Reaktion war mit Absorptionzunahmen bei 313 nm und 546 nm und einer Absorptionsabnahme bei 437 nm verbunden (Çinkaya 2002). Eine weitere Untersuchung dieses Phänomens mit Butyryl-CoA als Substrat und einer genaueren zeitlichen Auflösung mittels Stop-Flow in den ersten 100 ms nach Substratzugabe könnte Aufschluss über die Art der Interaktion mit dem Enzym geben und einen kinetischen Vergleich mit Crotonyl-CoA ermöglichen.

Die vom Substrat abhängige Umwandlung der Flavinzustände wurde mit EPR-Spektroskopie näher untersucht. Hierbei wurde bei allen getesteten Substraten ein Semichinonradikal nachgewiesen, dessen Spinkonzentration bereits nach einer Minute bei 4,2 bis 5,5 % der Konzentration der aktiven Zentren lag. Jedoch konnte keine zu den UV-Vis-Messungen proportionale zeitliche Änderung der Spinkonzentrationen gezeigt werden.

Messungen bei 10 bis 18 K sollten der Identifikation von Substratradikalen oder Eisen-Schwefel-Signalen dienen. Die für organische Radikale - beispielsweise das für die Katalyse postulierte Ketylradikal - typischen Signale sind ca. 30 bis 60 Gauss breit (Kim et al. 2008) und liegen genauso wie Flavinradikale bei g-Werten von ca. 2,00 (Müh et al. 1996; Näser et al. 2005).

Der Vergleich der Signalformen der EPR-Spektren von 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase in Gegenwart von Butyryl-CoA beziehungsweise Crotonyl-CoA mit freiem Coenzym A zeigt jedoch bei beiden Substraten verschiedene Überlagerung im Bereich von 3375 bis 3425 Gauss

($g = 1,96$ bis $2,00$; Abschnitt 3.11.2, Abbildung 35). Dieses Signal ließ sich durch Differenzspektren nicht eindeutig isolieren (Abbildung 36), jedoch zeigte sich, dass es bei Butyryl-CoA um ca. 40 Gauss gegenüber Crotonyl-CoA verschoben war. Dies wäre ein Hinweis auf Butyryl-CoA als natürliche Radikalfalle.

Wenn davon ausgegangen wird, dass Butyryl-CoA einen Teil des Reaktionszyklus (α - und β -Protonabstraktion und Bildung eines Ketylradikals) durchlaufen kann, würde ohne abstrahierbare Hydroxylgruppe eine mechanistische Sackgasse auf der Stufe des Ketylradikals entstehen. Da jedoch Butyryl-CoA nicht zu Crotonyl-CoA reagiert, könnte auch nur ein Enoxyradikal nach α -Protonabstraktion stabilisiert werden. Diese Radikale würden jedoch eine andere elektrische Umgebung als das natürliche Substratradikal aufweisen, welches über eine Hydroxylgruppe verfügt. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedliche Lage der nicht klar zu isolierenden Signalanteile bieten, die bei Crotonyl-CoA relativ zu Butyryl-CoA näher am Semichinonradikal liegen. Das Spektrum mit Butyryl-CoA weist eine zusätzliche um ca. 40 Gauss verschobene Schulter auf und die Symmetrie des Flavinsignals ist leicht verschoben (Abbildungen 35 und 36). Die Unterschiede in der Signalform zum natürlichen Substrat würden dann durch die im postulierten natürlichen Katalyseweg (Müh et al. 1997; Buckel und Golding 1999) zusätzlich auftretenden Ketylradikal- und Dienoxyradikalintermediate, deren Signale sich überlagern sollten, erklärt werden.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit deuten neben einer ähnlichen Positionierung der verschiedenen Substrate relativ zum Flavin auf eine Teilreaktion (α -Protonabstraktion & Substratradikalbildung) mit Butyryl-CoA hin.

Es wurden keine eindeutigen Hinweise auf EPR-Signale eines $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters in Gegenwart von Substrat gefunden. Zwar legt der rhombische Signalanteil die Präsenz eines Fe-S-Clusters nahe, jedoch ist die Bandbreite des Signals mit ca. 200 Gauss zu gering. Der Vergleich mit anderen typischen Fe-S-Cluster Signalen zeigt, dass diese höhere Signalbreiten (über 500 Gauss) oder andere Signalformen aufweisen [Abbildung 44; (Hagen und Albracht 1982; Dickert et al. 2002; Thamer et al. 2003; Balk et al. 2004); Reiner Hedderich, Max-Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, persönliche Mitteilung]. Somit kann das rhombische Signal in Gegenwart von Substrat nicht eindeutig mit einem $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster korreliert werden.

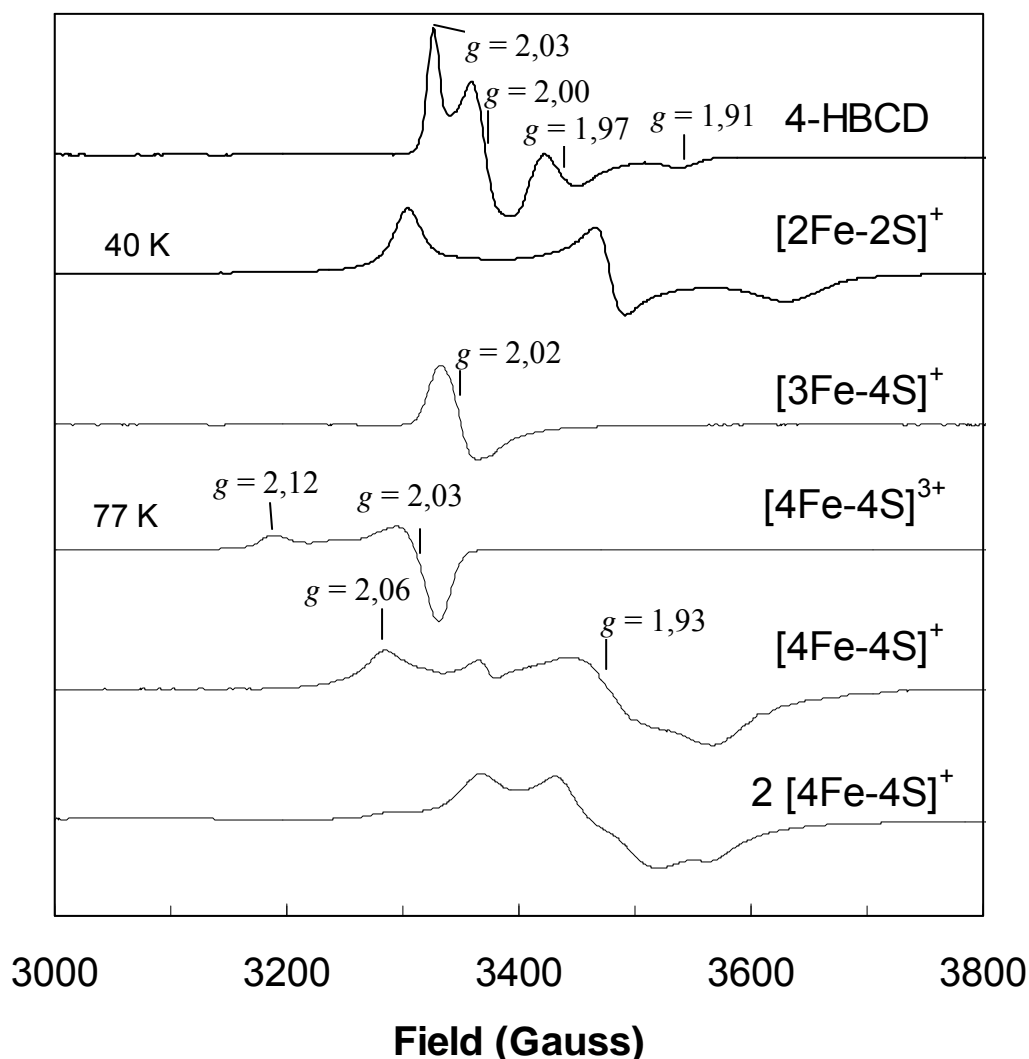


Abbildung 44. 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase mit Crotonyl-CoA (4-HBCD, Kaliumhexacyanoferrat) im Vergleich mit typischen Signalen anderer EPR-aktiver Clusterformen: $[2Fe-2S]^+$ -Cluster in reduziertem Ferredoxin aus Spinatblättern (Hagen und Albracht 1982); $[4Fe-4S]^+$ -Cluster in mit Dithionit teilreduzierter Heterodisulphid-Reduktase aus *Methanothermobacter marburgensis* (9.459 GHz, 20mW, 30K; Reiner Hedderich, Max-Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, persönliche Mitteilung); zwei interagierende $[4Fe-4S]^+$ -Cluster in vollständig reduziertem Ferredoxin aus *Acidaminococcus fermentans* (9.65 GHz, 2mW, 12 K; (Thamer et al. 2003). Graphik modifiziert nach (Balk et al. 2004)

Frühere EPR-Messungen an photoreduzierter 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ohne Substrat zeigen ein rhombisches Signal, welches dem $[4Fe-4S]^+$ -Cluster zugeordnet wurde [Abbildung 45, (Çinkaya 2002)]. Der Vergleich mit den zuvor oxidierten und danach mit Substrat equilibrierten Proben zeigt, dass die g -Werte der rhombischen Anteile bis auf $g = 2,03$ nicht übereinstimmen und das zusätzlich eine Überlagerung durch das Flavinsemichinonradikal bei $g = 2,00$ beobachtet wird. Da jedoch die anderen rhombischen Signalkomponenten nicht bei den entsprechenden g -Werten auftreten, kann in Gegenwart von

Substrat ein $[4\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters nicht eindeutig gezeigt werden. Denkbar wäre jedoch, dass die übrigen Signalanteile durch die Gegenwart von Substrat verschoben sind. Es wurden jedoch in Differenzspektren keine deutlichen Verschiebungen der rhombischen Anteile mit Butyryl-CoA gegenüber Crotonyl-CoA beobachtet, das bei Umwandlung zu 4-Hydroxybutyryl-CoA mit dem Cluster koordinieren könnte (Tabelle 9, Abschnitt 3.11.2).

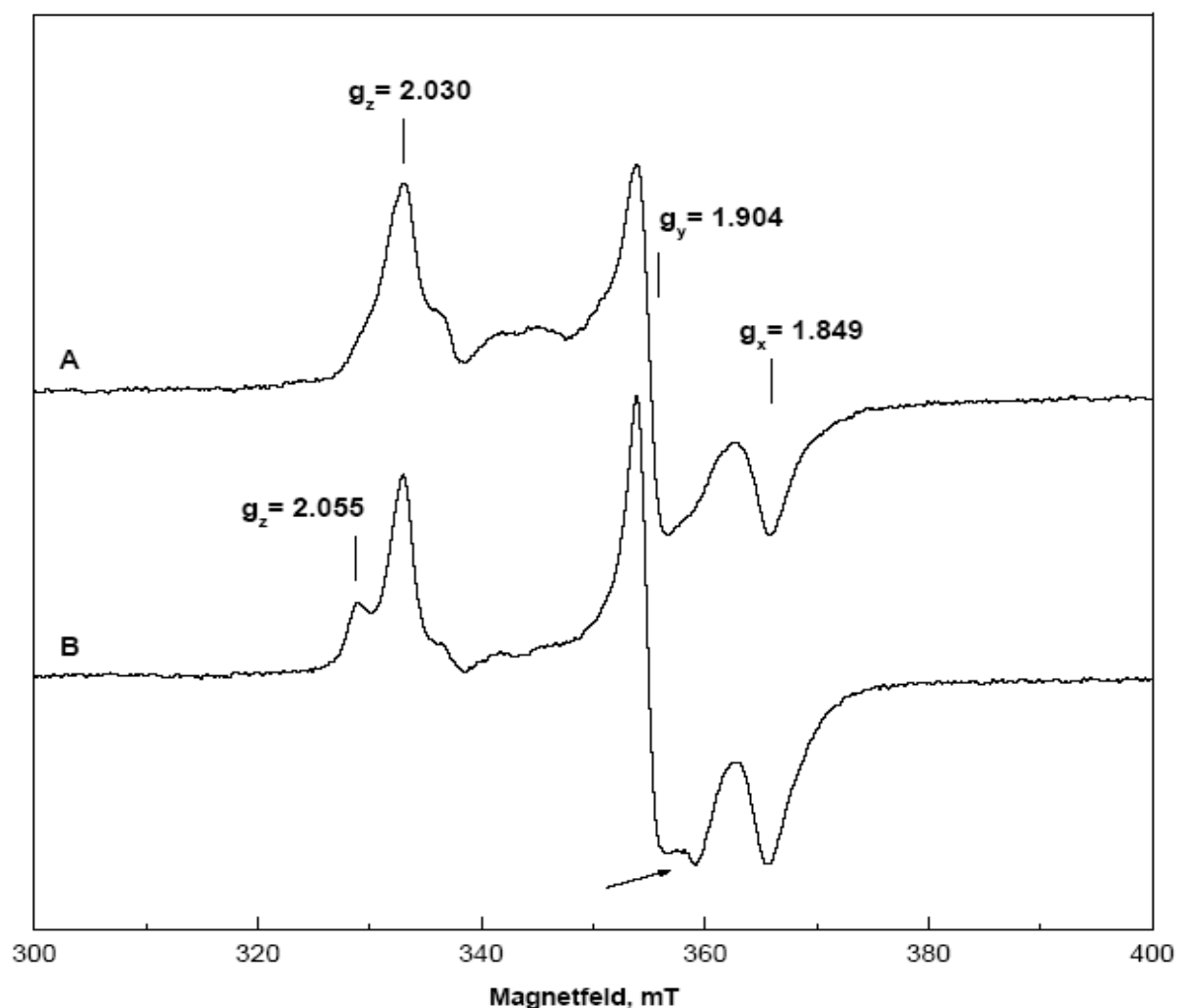


Abbildung 45. 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nach Photoreduktion in Gegenwart von 5-Deazaflavin. Darstellung eines rhombischen Signals bei 4,2 (A) und 10 K (B). Das isotrope Semichinon ist durch vollständig zum Hydrochinon (EPR inaktiv) reduziert worden (Çinkaya 2002).

4.3.3 Butyryl-CoA als Substrat der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Für 4-Hydroxybutyryl-CoA als Substrat der Dehydratase wurde die Abstraktion des 2*Re*-Protons festgestellt, wobei in Übereinstimmung mit dem Substratbindemodell His292 die wahrscheinliche Base hierfür ist (Abschnitt 4.3.1) (Martins et al. 2004; Friedrich et al. 2008a; Friedrich et al. 2008b).

Die Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase und die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase weisen eine strukturelle Ähnlichkeit bei der Substratbindung und dem Aufbau des aktiven Zentrums sowie eine Übereinstimmung der Stereoselektivität auf. Daher wurde angenommen, dass die Dehydratase auch Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität besitzen könnte. Jedoch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Butyryl-CoA von der Dehydratase mit Hilfe eines künstlichen Elektronen Akzeptors (Ferricenium, Fe^{3+}) nicht zu Crotonyl-CoA umgesetzt wurde. Dies wurde sowohl mit hochreiner aus *C. aminobutyricum* gewonnener (Abschnitt 3.3) als auch mit der rekombinant in *E. coli* produzierten (Zhang, unveröffentlichte Daten) 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase beobachtet.

Der Austausch des α -Protons von Butyryl-CoA in D_2O durch 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase war mit MALDI-TOF-MS ebenfalls nicht nachweisbar (Abbildung 12, Abschnitt 3.3). Dies spricht gegen α -Deprotonierung von Butyryl-CoA durch die Dehydratase. Wird His292 auch hier als Base angenommen, so scheint es möglich, dass der Austausch aufgrund der Abschirmung von His292 vom Lösungsmittel nicht erfolgen kann (Martins et al. 2004) & Berta Martins, Universität Bayreuth, persönliche Mitteilung).

4.3.4 Reaktionsmechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase

Das am häufigsten verwendete Modell für die Dehydratisierung ist die Eliminierung des der Hydroxylgruppe benachbarten Protons unter Wasserabspaltung. Dieser Mechanismus erfordert für die meisten Dehydratasen (z.B. Aconitase) die Abspaltung eines bereits aktivierten α -Protons. In 4-Hydroxybutyryl-CoA wurde für das fragliche β -Proton ein pK -Wert von ca. 40 geschätzt (Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b). Dieses ist demnach für eine Initiation der Dehydratisierung nicht ausreichend aktiviert. Die kinetischen Daten mit 4-Hydroxy[2- $^2\text{H}_2$]butyryl-CoA und 4-Hydroxy[3- $^2\text{H}_2$]butyryl-CoA als Substrat weisen auf die Abstraktion des α -Protons als initialem Schritt hin [Abschnitt 1.4; (Çinkaya 1996)].

In den hier vorgestellten Modellen beginnt deshalb die Reaktion durch Abstraktion des bereits durch die Nachbarschaft zu einem Thioestercarbonyl aktivierten α -Wasserstoffs. Vor der Aufklärung der Kristallstruktur wurde aufgrund des Flavinkofaktors und der Δ^2, Δ^3 -Isomeraseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase zunächst ein Mechanismus über Hydridtransfer postuliert [Abbildung 5, Abschnitt 1.5.2; (Scherf und Buckel 1993)]. Das dafür nötige Übergang zum Hydrochinonzustand des Flavins reversibel möglich ist, konnte durch die Verwendung stärkerer Reduktionsmittel (z.B. Dithionit) gezeigt werden (Çinkaya 2002).

Es ist fraglich ob das postulierte Intermediat 4-Hydroxycrotonyl-CoA genügend aktiviert ist, um durch SN_2' (Nukleophile Substitution mit Umlagerung von Doppelbindungen) des Hydrids am α -Kohlenstoff die Hydroxylgruppe zu eliminieren (Magid 1980), welche durch den [4Fe-4S]-Cluster zusätzlich polarisiert wäre (Beinert und Kennedy 1989). Obwohl bei diesem Mechanismusvorschlag ein planares Dienolat postuliert wird, dessen Existenz durch die Experimente zur Stereoselektivität am C4 angezeigt wird, ist das Intermediat 4-Hydroxycrotonyl-CoA wahrscheinlich eine mechanistische Sackgasse.

Da gezeigt werden konnte, dass die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ein Flavinsemichinonradikal stabilisieren kann, dessen Spinkonzentration bei Substratzugabe zunimmt (Çinkaya 2002), wurde ein radikalischer Mechanismus für die 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase postuliert [Abbildung 6, Abschnitt 1.5.2; (Müh et al. 1997; Buckel und Golding 1999)]. Hierbei treten die für ein Semichinonradikal typischen isotropen EPR-Signale bei g -Werten um 2,00 und nicht näher identifizierte organische Radikalsignale auf (Abschnitte 3.11 und 4.3.2). Es werden ausgehend vom zuvor oxidierten Kofaktor substratinduziert Spinkonzentrationen von ca. 10 % bestimmt [Abschnitt 3.11.1; (Müh et al. 1996; Steensma et al. 1996; Näser et al. 2005)].

Die für diesen Mechanismusvorschlag postulierten radikalischen Substratintermediate sind sehr reaktiv: Enolisierung durch His292 mit anschließender Elektronenübertragung zum Flavin resultiert in einem Enoxy-Substrat-Radikal, für das eine Senkung des pK -Werts des zuvor unaktivierten β -Protons um 26 auf pK 14 berechnet wurde (Smith et al. 2003a; Smith et al. 2003b). Durch H-Brücken des Thioestercarbonyls zu Ala460-NH und der 2'-Hydroxylgruppe des Flavins wird eine weitere Senkung des pK -Werts auf ca. 8 angenommen (Engst et al. 1999; Bahnson et al. 2002). Das nach β -Protonentransfer vom Substrat zum Flavinsemichinon gebildete Ketylradikalintermediat kann nun die durch den [4Fe-4S]-Cluster polarisierte Hydroxylgruppe abspalten, wodurch ein Dienoxy-

Substratradikal entsteht. Dessen Reduktion zum planaren Dienolat ist wiederum in Übereinstimmung mit den Experimenten zur Stereoselektivität am C4.

Da auch in Anwesenheit von nicht natürlichen Substraten ein Semichinonradikal auftritt und noch kein Substratradikal nachgewiesen werden konnte, kann der Mechanismus über Hydridtransfer nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Jedoch ist das Auftreten des Semichinonradikals nach Substratgabe ein starker Indikator für einen radikalischen Mechanismus. Der Hydridtransfermechanismus wäre zudem umständlicher, denn es müssten zunächst zwei Elektronen und ein Proton auf das Flavin übertragen werden, damit danach eine SN2' zum Vinylacetyl-CoA erfolgen könnte. Im Modell ohne Hydridtransfer würde nur eine zyklische Einelektronenübertragung benötigt. Darüber hinaus würde dabei mit 4-Hydroxycrotonyl-CoA ein weniger aktiviertes Intermediat gebildet, als bei dem über ein Enoxyradikal postulierten Katalyseweg.

4.3.5 Ausblick und Schluss

Die vollständige Aufklärung der Stereoselektivität der Reaktion der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase eröffnet die Möglichkeit durch Vergleiche mit der Kristallstruktur die bisherigen Substratbindungs- und Mechanismusmodelle in neuem Licht zu betrachten. Daraus ergeben sich für dieses komplexe Enzym noch viele Fragestellungen: beispielsweise nach der Vinylacetyl-CoA-Isomerase- oder der Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität.

Da die Stereoselektivität für die α - und β -Position identisch mit dem Verlauf bei den Acyl-CoA-Dehydrogenasen ist (Biellmann und Hirth 1970a; Biellmann und Hirth 1970b; La Roche et al. 1971; Polito und Sweeley 1971) und strukturelle Gemeinsamkeiten (Kim und Wu 1988; Kim et al. 1993; Martins et al. 2004) der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase bestehen, kann ein gemeinsamer Mechanismus vermutet werden. Jedoch lies sich keinerlei Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase nachweisen. Bei der Dehydratase erscheint ein Mechanismus über Einelektronen-Redoxreaktion die einzige realistische Möglichkeit, während bei den Dehydrogenasen ein Hydridtransfer von C-3 zum FAD favorisiert wird (Ghisla und Thorpe 2004). Andererseits gibt es auch Untersuchungen der Mittelketten-Acyl-CoA-Dehydrogenase, deren Resultate besser mit radikalischen Zwischenstufen zu vereinbaren sind (Lenn et al. 1989).

Obwohl Art und Anzahl der Elektronenübertragungen zum FAD noch nicht eindeutig bestimmt werden konnten, ließen sich abschließend bessere Argumente für einen radikalischen Mechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase ohne Hydridtransfer finden [Abbildung 6, Abschnitt 1.5.2; (Müh et al. 1997; Buckel und Golding 1999)]. Dieser liefert das energetisch günstigere und besser mit den experimentellen Daten übereinstimmende Modell.

Versuche mit *trans*-4-Hydroxycrotonyl-CoA als Substrat könnten hier wichtige Erkenntnisse liefern, je nachdem ob ein Umsatz dieses Substrats mit zum Hydrochinon reduzierten Flavinkofaktor möglich ist, oder ob es bei Katalyse unter oxidierten Bedingungen als Inhibitor wirkt. Inhibition würde dabei zeigen, dass die Hydroxylgruppe nicht ausreichend aktiviert werden kann, um abstrahiert zu werden, und somit den radikalischen Mechanismus ohne Hydridtransfer bestätigen.

Weitere Untersuchungen zum initialen Schritt (α -Protonabstraktion) und zur Modulation von His292 als Base könnten erfolgen, wenn es gelänge den Cluster in die [3Fe-4S]-Form zu bringen [vgl. Aconitase, (Emptage et al. 1983a)]. Sollte die Koordinierung des His292 mit dem Fe1 des Clusters die fehlende Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität der Dehydratase erklären, so sollte nun Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität nachgewiesen werden können. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass Ferriceniumhexafluorophosphat ein für die Dehydratase zugänglicher Elektronenakzeptor ist.

Mutationen des Clusterbindemotivs (C99A, C103A, H292E, C299A) haben zu einer Verringerung des Eisengehalts der Dehydratase von 12 auf 8 pro Homotetramer (gemessen vor Rekonstitution mit FeCl₃ und Na₂S) geführt. Dies weist auf eine [3Fe-4S]-Konstitution des Cluster in den Mutanten hin, obwohl diese Resultate bisher noch nicht durch EPR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden konnten. Die Dehydrataseaktivität ging in allen Mutanten komplett verloren (Zhang und Buckel, unveröffentlichte Daten). Die Zerstörung des Clusters mit Sauerstoff führte nicht zu einem Enzym das Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität zeigt (Zhang und Buckel, unveröffentlichte Daten).

Für die Vinylacetyl-CoA Isomeraseaktivität der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase wird α -Deprotonierung als initialer Schritt angenommen (Müh et al. 1996). Dies sollte ebenfalls für die postulierte Butyryl-CoA-Dehydrogenaseaktivität gelten, bei der diese nicht

nachgewiesen werden konnte (Abbildung 12, Abschnitte 3.3 und 4.3.3). Das Substrat der Isomerisierung Vinylacetyl-CoA könnte hier zusätzlich durch eine Doppelbindung aktiviert sein, so dass die initiale α -Deprotonierung leichter erfolgen kann als bei Butyryl-CoA. Untersuchungen zur Stereoselektivität der Isomerasereaktion, sowie ein Migrationsexperiment (analog zu Abschnitt 3.13) mit $[2\text{-}^2\text{H}_2]$ Vinylacetyl-CoA würden Aufschlüsse über hierbei aktiven Basen liefern.

Eine gute Ergänzung zu den Mössbauerstudien dieser Arbeit (Abschnitt 3.7) wäre eine ENDOR-Studie mit $4\text{-}[4\text{-}^{17}\text{O}]\text{Hydroxybutyryl-CoA}$. Hier könnte eine Interaktion der Hydroxylgruppe mit dem FeI des Clusters leichter nachzuweisen sein, da der Kern mit dem ungeraden Spin nur eine koordinative Bindung von diesem entfernt liegt (im Gegensatz zu $4\text{-Hydroxy}[4\text{-}^{13}\text{C}]\text{butyryl-CoA}$) und damit ein stärkerer Effekt zu erwarten wäre. Allerdings müsste, um einen Austausch der markierten Hydroxylgruppe mit dem Lösungsmittel zu vermeiden, die Probenpräparation mit Freeze-Quench erfolgen.

Mössbauerstudien mit Vinylacetyl-CoA und Crotonyl-CoA-Proben, die mittels Rapid-Freeze-Quenching erzeugt wurden, könnten zeigen, dass erst nach der Isomerisierung eine Beteiligung des Clusters erfolgt, wenn dieser bei der Addition einer Hydroxylgruppe an das Substrat als Lewis-Säure wirkt.

Da der Nachweis eines Substratradikals durch die Überlagerung mit verschiedenen Signalen schwierig ist, könnten EPR-Messungen mit selektiv markiertem $[2\text{-}^2\text{H}_2]$ - bzw. $[3\text{-}^2\text{H}_2]$ Butyryl-CoA und $[2\text{-}^2\text{H}]$ - bzw. $[3\text{-}^2\text{H}]\text{Crotonyl-CoA}$ erfolgen. Da Deuterium eine Verschmälerung der EPR-Signale hervorruft, könnten durch Vergleiche mit unmarkierten Proben (Abschnitt 3.11) Signalkomponenten den postulierten Substratradikalen zugeordnet werden. Bei der Untersuchung einer Markierung in der C4 Position oder stereoselektiv für $2R$ und $3S$ in $(2R, 3S)\text{-4-Hydroxy}[2\text{-}^2\text{H}_1, 3\text{-}^2\text{H}_1, 4\text{-}^2\text{H}_2]\text{butyryl-CoA}$ müsste die Probenpräparation wiederum mit Freeze-Quench erfolgen.

Literaturverzeichnis

- Adolph HW, Kiefer M, Zeppezauer M (1993) The influence of pH on the substrate specificity and stereoselectivity of alcohol dehydrogenase from horse liver. *Adv. Exp. Med. Biol.* 328:401-410
- Adolph HW, Maurer P, Schneider-Bernlohr H, Sartorius C, Zeppezauer M (1991) Substrate specificity and stereoselectivity of horse liver alcohol dehydrogenase. Kinetic evaluation of binding and activation parameters controlling the catalytic cycles of unbranched, acyclic secondary alcohols and ketones as substrates of the native and active-site-specific Co(II)-substituted enzyme. *Eur. J. Biochem.* 201:615-625
- Amyes TL, Richard JP (1992) Generation and stability of a simple thiol ester enolate in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* 114:10297-10302
- Anxolabéhère-Mallart E, Glaser T, Frank P, Aliverti A, Zanetti G, Hedman B, Hodgson KO, Solomon EI (2001) Sulfur K-Edge X-ray Absorption Spectroscopy of 2Fe-2S Ferredoxin: Covalency of the Oxidized and Reduced 2Fe Forms and Comparison to Model Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 123:5444-5452
- Armarego WL, Milloy BA, Pendergast W (1976) A highly stereospecific synthesis of (*R*)- and (*S*)-[2-³H]Glycine. *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*:2229-2237
- Austin AT, Howard J (1961) The Reaction of nitrous acid with glutamine and glutamic acid. *J. Chem. Soc.*:3593
- Bahnson BJ, Anderson VE, Petsko GA (2002) Structural mechanism of enoyl-CoA hydratase: Three atoms from a single water are added in either an E1cb stepwise or concerted fashion. *Biochemistry* 41:2621-2629
- Baldwin JE, North M, Flinn A (1988) Synthesis and rearrangement of homoserine derivatives. *Tetrahedron* 44:637-642
- Balk J, Pierik AJ, Netz DJ, Muhlenhoff U, Lill R (2004) The hydrogenase-like Nar1p is essential for maturation of cytosolic and nuclear iron-sulphur proteins. *Embo J.* 23:2105-2115
- Barker HA (1961) Fermentation of nitrogenous compounds. In: Gunsalus IC, Stanier RY (eds) *The bacteria*. Academic Press, New York, p 151-207
- Barker HA (1978) Explorations of bacterial metabolism. *Annual Review of Biochemistry* 47:1-33
- Barker HA (1981) Amino acid degradation by anaerobic bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 50:23-40
- Battersby AR, Buckley DG, Staunton J, Williams PJ (1979) Studies of enzyme-mediated reactions. Part 10. Stereochemical course of the dehydrogenation of stereospecifically labelled 1-aminoheptanes by the amine oxidase from rat liver mitochondria (E.C.1.4.3.4). *J. Chem. Soc. [Perkin 1]*:2550 - 2558
- Bauer R, Adolph HW, Andersson I, Danielsen E, Formicka G, Zeppezauer M (1991) Coordination geometry for cadmium in the catalytic zinc site of horse liver alcohol dehydrogenase: studies by PAC spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* 20:215-221
- Beinert H, Kennedy MC (1989) 19th Sir Hans Krebs lecture. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. A tool for the study of protein and cluster chemistry and mechanism of iron-sulfur enzymes. *Eur. J. Biochem.* 186:5-15
- Beinert H, Kennedy MC, Stout CD (1996) Aconitase as iron-sulfur protein, enzyme, and iron-regulatory protein. *Chem. Rev.* 96:2335-2374
- Beinert H, Page E (1957) On the mechanism of dehydrogenation of fatty acyl derivatives of coenzyme A. V. Oxidation-reductions of the flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 225:479-497

- Berg IA, Kockelkorn D, Buckel W, Fuchs G (2007) A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in Archaea. *Science* 318:1782-1786
- Bertini I, Capozzi F, Luchinat C, Piccioli M, Vila AJ (1994) The Fe₄S₄-centers in ferredoxins studied through proton and carbon hyperfine coupling - Sequence-specific assignments of cysteines in ferredoxins from *Clostridium acidi-urici* and *Clostridium pasteurianum*. *J. Am. Chem. Soc.* 116:651-660
- Beutler H-O, Michal G (1974) Glutamate: Determination with dehydrogenase, diaphorase and tetrazolium salts. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn. VCH, Weinheim, pp 1753-1759
- Biellmann JF, Hirth CG (1970a) Stereochemistry of the oxidation at the alpha-carbon of butyryl-CoA and of the enzymic hydrogen exchange. *FEBS Lett.* 9:335-336
- Biellmann JF, Hirth CG (1970b) Stereochemistry of the oxidation at the beta-carbon of butyryl-SCoA. *FEBS Lett.* 8:55-56
- Bowers A, Halsall TG, Jones ERH, Lemin AJ (1953) The chemistry of the triterpenes and related compounds. Part XVIII. Elucidation of the structure of polyporenic acid C. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*:2548 - 2560
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254
- Bremer E, Krämer R (2000) Coping with osmotic challenges: Osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In: Storz G, Hengge-Aronis R (eds) *Bacterial stress responses*. ASM Press, Washington, D.C., p 79-97
- Brewster P, Hiron F, Hughes ED, Ingold CK, Rao PA (1950) Configuration of carbohydrates, hydroxy-acids and amino acids. *Nature* 166:178-179
- Brock M, Maerker C, Schutz A, Völker U, Buckel W (2002) Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur. J. Biochem.* 269:6184-6194
- Buckel W (1980a) Analysis of the fermentation pathways of clostridia using double labelled glutamate. *Arch. Microbiol.* 127:167-169
- Buckel W (1980b) The reversible dehydration of (R)-2-hydroxyglutarate to (E)-glutaconate. *Eur. J. Biochem.* 106:439-447
- Buckel W (1986) Biotin-dependent decarboxylases as bacterial sodium pumps: Purification and reconstitution of glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*. *Methods Enzymol.* 125:547-558
- Buckel W (2001a) Sodium ion-translocating decarboxylases. *Biochim. Biophys. Acta* 1505:15-27
- Buckel W (2001b) Unusual enzymes involved in five pathways of glutamate fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57:263-273
- Buckel W (2003) Archerasen - eine wachsende Enzymfamilie katalysiert ATP-induzierten Elektronentransport. *BIOspektrum* 9:146-149
- Buckel W, Barker HA (1974) Two pathways of glutamate fermentation by anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 117:1248-1260
- Buckel W, Bobi A (1975) The enzyme complex citramalate lyase from *Clostridium tetanomorphum*. *Eur. J. Biochem.* 64:255-262
- Buckel W, Buschmeier V, Eggerer H (1971) The action mechanism of citrate lyase from *Klebsiella aerogenes*. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352:1195-1205
- Buckel W, Dorn U, Semmler R (1981) Glutaconate CoA-transferase from *Clostridium tetanomorphum*. *Eur. J. Biochem.* 118:315-321
- Buckel W, Golding BT (1999) Radical species in the catalytic pathways of enzymes from anaerobes. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:523-541

- Buckel W, Golding BT (2006) Radical enzymes in anaerobes. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:27-49
- Buckel W, Janssen PH, Schuhmann A, Eikmanns U, Messner U, Sleytr U, Liesack W (1994) *Clostridium viride* sp. nov., a strictly anaerobic bacterium using 5-aminovalerate as growth substrate, previously assigned to *Clostridium aminovalericum*. *Arch. Microbiol.* 162:387-394
- Buckel W, Keese R (1995a) Einelektronen-Redoxreaktionen von Coenzym-A-Estern in anaeroben Bakterien - ein Vorschlag für einen neuen Mechanismus. *Angew. Chem.* 107:1595-1598
- Buckel W, Keese R (1995b) One-Electron Redox Reactions of CoASH Esters in Anaerobic Bacteria - A Mechanistic Proposal. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34:1502-1506
- Buckel W, Martins BM, Messerschmidt A, Golding BT (2005) Radical-mediated dehydration reactions in anaerobic bacteria. *Biol. Chem.* 386:951-959
- Buckel W, Miller SL (1987) Equilibrium constants of several reactions involved in the fermentation of glutamate. *Eur. J. Biochem.* 164:565-569
- Castanie-Cornet MP, Penfound TA, Smith D, Elliott JF, Foster JW (1999) Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181:3525-3535
- Çinkaya I (1996) 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum* Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus mit regiospezifisch deuterierten Substraten. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Çinkaya I (2002) Substrat induzierte Radikalbildung in dem Eisen-Schwefel-Flavoenzym 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
- Çinkaya I, Buckel W, Medina M, Gomez-Moreno C, Cammack R (1997) Electron-nuclear double resonance spectroscopy investigation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: comparison with other flavin radical enzymes. *Biol. Chem.* 378:843-849
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow JA (1994) The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44:812-826
- Cooke A, Anderson A, Bennett J, Buchanan K, Gemmell D, Hamilton N, Maidment M, McPhail P, Stevenson D, Sundaram H (2003) Novel alpha-amino-acid phenolic ester derivatives with intravenous anaesthetic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13:1107-1110
- Cooper SJ, Garner CD, Hagen WR, Lindley PF, Bailey S (2000) Hybrid-cluster protein (HCP) from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) at 1.6 Å resolution. *Biochemistry* 39:15044-15054
- Cornforth JW (1959) Biosynthesis of fatty acids and cholesterol considered as chemical processes. *J. Lipid Res.* 1:3-28
- Cornforth JW (1970) The chiral methyl group - its biochemical significance. *Chem. Ber.* 6:431-436
- Cornforth JW, Redmond JW, Eggerer H, Buckel W, Gutschow C (1969) Asymmetric methyl groups, and the mechanism of malate synthase. *Nature* 221:1212-1213
- Creighton DJ, Murthy NSRK (1990) Stereochemistry of enzyme-catalysed reactions at carbon. In: Sigman DS, Boyer PD (eds) *The Enzymes*. Academic Press, San Diego, USA
- Dale JA, Dull DL, Mosher HS (1969) α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *J. Org. Chem.* 34:2543-2549

- Dale JA, Mosher HS (1968) Nuclear magnetic resonance nonequivalence of diastereomeric esters of α -substituted phenylacetic acids for the determination of stereochemical purity. *J. Am. Chem. Soc.* 90:3732-3738
- Dale JA, Mosher HS (1973) Nuclear magnetic resonance enantiomer reagents. Configurational correlations via nuclear magnetic resonance chemical shifts of diastereomeric mandelate, O-methylmandelate, and α -methoxy- α -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) esters. *J. Am. Chem. Soc.* 95:512-519
- Darnault C, Volbeda A, Kim EJ, Legrand P, Vernede X, Lindahl PA, Fontecilla-Camps JC (2003) Ni-Zn-[Fe₄-S₄] and Ni-Ni-[Fe₄-S₄] clusters in closed and open subunits of acetyl-CoA synthase/carbon monoxide dehydrogenase. *Nat. Struct. Biol.* 10:271-279
- Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM (1987) Vitamins and coenzymes. In: Dawson RMC (ed) *Data for biochemical research*. Oxford University Press, New York, pp 115-139
- Decker K (1959) Die aktivierte Essigsäure: das Coenzym A und seine Acylderivate im Stoffwechsel der Zelle. F. Enke, Stuttgart
- Dickert S, Pierik AJ, Buckel W (2002) Molecular characterization of phenyllactate dehydratase and its initiator from *Clostridium sporogenes*. *Molecular Microbiology* 44:49-60
- Dickert S, Pierik AJ, Linder D, Buckel W (2000) The involvement of coenzyme A esters in the dehydration of (*R*)-phenyllactate to (*E*)-cinnamate by *Clostridium sporogenes*. *Eur. J. Biochem.* 267:3874-3884
- Dickson DPE (1984) Applications to biological systems. In: Lang GJ (ed) *Mössbauer spectroscopy applied to inorganic chemistry*. Plenum Press, New York, pp 339-389
- Dimroth P, Eggerer H (1975) Isolation of subunits of citrate lyase and characterisation of their function in the enzyme complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3458-3462
- Dobbek H, Svetlitchnyi V, Gremer L, Huber R, Meyer O (2001) Crystal structure of a carbon monoxide dehydrogenase reveals a [Ni-4Fe-5S] cluster. *Science* 293:1281-1285
- D'Ordine RL, Bahnson BJ, Tonge PJ, Anderson VE (1994) Enoyl-coenzyme A hydratase-catalyzed exchange of the α -protons of coenzyme A thiol esters: a model for an enolized intermediate in the enzyme-catalyzed elimination? *Biochemistry* 33:14733-14742
- Dorner C, Schink B (1990) *Clostridium homopropionicum* sp. nov., a new strict anaerobe growing with 2-, 3-, or 4-hydroxybutyrate. *Arch. Microbiol.* 154:342-348
- Doukov TI, Iverson TM, Seravalli J, Ragsdale SW, Drennan CL (2002) A Ni-Fe-Cu center in a bifunctional carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Science* 298:567-572
- Drennan CL, Heo J, Sintchak MD, Schreiter E, Ludden PW (2001) Life on carbon monoxide: X-ray structure of *Rhodospirillum rubrum* Ni-Fe-S carbon monoxide dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11973-11978
- Emptage MH, Dreyers JL, Kennedy MC, Beinert H (1983a) Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase. *J. Biol. Chem.* 258:11106-11111
- Emptage MH, Kent TA, Kennedy MC, Beinert H, Munck E (1983b) Mössbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4674-4678
- Engel CK, Kiema TR, Hiltunen JK, Wierenga RK (1998) The crystal structure of enoyl-CoA hydratase complexed with octanoyl-CoA reveals the structural adaptations required for binding of a long chain fatty acid-CoA molecule. *J. Mol. Biol.* 275:847-859
- Engel PC, Massey V (1971) Green butyryl-coenzyme A dehydrogenase. An enzyme-acyl-coenzyme A complex. *Biochem. J.* 125:889-902

- Engst S, Vock P, Wang M, Kim JJ, Ghisla S (1999) Mechanism of activation of acyl-CoA substrates by medium chain acyl-CoA dehydrogenase: interaction of the thioester carbonyl with the flavin adenine dinucleotide ribityl side chain. *Biochemistry* 38:257-267
- Finn MG (2002) Emerging methods for the rapid determination of enantiomeric excess. *Chirality* 14:534-540
- Flint DH (1993) *Escherichia coli* fumarase A catalyzes the isomerization of enol and keto oxalacetic acid. *Biochemistry* 32:799-805
- Flint DH, Emptage MH (1988) Dihydroxy acid dehydratase from spinach contains a [2Fe-2S] cluster. *J. Biol. Chem.* 263:3558-3564
- Flint DH, Emptage MH, Guest JR (1992) Fumarase A from *Escherichia coli*: purification and characterization as an iron-sulfur cluster containing enzyme. *Biochemistry* 31:10331-10337
- Fraser RR (1983) Nuclear magnetic resonance analysis using chiral shifts reagents. In: Morrison JD (ed) *Asymmetric Synthesis*. Academic Press, New York, p 173
- Friedrich P (2003) Untersuchungen zur Substrat-Stereochemie der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und zum Mechanismus der 4-Hydroxybutyrat-CoA-Transferase aus *Clostridium aminobutyricum*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Friedrich P, Darley DJ, Golding BT, Buckel W (2008a) The complete stereochemistry of the enzymatic dehydration of 4-hydroxybutyryl coenzyme A to crotonyl coenzyme A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47:3254-3257
- Friedrich P, Darley DJ, Golding BT, Buckel W (2008b) Der stereochemische Verlauf der enzymatischen Wassereliminierung von 4-Hydroxybutyryl-Coenzym A zu Crotonyl-Coenzym A. *Angew. Chem.* 120:3298-3301
- Furuta S, Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T, Ui N (1980) Properties of mitochondria and peroxisomal enoyl-CoA hydratases from rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* 88:1059-1070
- Gerhardt A, Çinkaya I, Linder D, Huisman G, Buckel W (2000) Fermentation of 4-aminobutyrate by *Clostridium aminobutyricum*: cloning of two genes involved in the formation and dehydration of 4-hydroxybutyryl-CoA. *Arch. Microbiol.* 174:189-199
- Gharbia SE, Shah HN (1991) Pathways of glutamate catabolism among *Fusobacterium* species. *J. Gen. Microbiol.* 137:1201-1206
- Ghisla S, Thorpe C (2004) Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur. J. Biochem.* 271:494-508
- Ghisla S, Thorpe C, Massey V (1984) Mechanistic studies with general acyl-CoA dehydrogenase and butyryl-CoA dehydrogenase: evidence for the transfer of the beta-hydrogen to the flavin N(5)-position as a hydride. *Biochemistry* 23:3154-3161
- Grandoni JA, Switzer RL, Makaroff CA, Zalkin H (1989) Evidence that the iron-sulfur cluster of *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase determines stability of the enzyme to degradation in vivo. *J. Biol. Chem.* 264:6058-6064
- Hagen WR, Albracht SP (1982) Analysis of strain-induced EPR-line shapes and anisotropic spin-lattice relaxation in a [2Fe-2S] ferredoxin. *Biochim. Biophys. Acta* 702:61-71
- Hans M, Buckel W, Bill E (2000) The iron-sulfur clusters in 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. Biochemical and spectroscopic investigations. *Eur. J. Biochem.* 267:7082-7093
- Hanson KR, Rose IA (1963) The Absolute Stereochemical Course of Citric Acid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50:981-988
- Hardman JK (1962) γ -Hydroxybutyrate dehydrogenase from *Clostridium aminobutyricum*. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press, p 778-783
- Hardman JK, Stadtman TC (1960) Metabolism of omega-amino acids. I. Fermentation of γ -aminobutyric acid by *Clostridium aminobutyricum n. sp.* *J. Bacteriol.* 79:544-548

- Hardman JK, Stadtman TC (1963) Metabolism of omega-amino acids. III. Mechanism of conversion of γ -aminobutyrate to γ -hydroxybutyrate by *Clostridium aminobutyricum*. J. Biol. Chem. 238:2081-2087
- Harris J, Kleanthous C, Coggins JR, Hawkins AR, Abell C (1993) Different mechanistic and stereochemical courses for the reactions catalysed by type I and type II dehydroquinases. J. Chem. Soc., Chem. Commun.:1080 - 1081
- Härtel U, Buckel W (1996) Sodium ion-dependent hydrogen production in *Acidaminococcus fermentans*. Arch. Microbiol. 166:350-356
- Hartrampf G, Buckel W (1986) On the steric course of the adenosylcobalamin-dependent 2-methyleneglutarate mutase reaction in *Clostridium barkeri*. Eur. J. Biochem. 156:301-304
- Heider J (2001) A new family of CoA-transferases. FEBS Lett. 509:345-349
- Herdegen T (1997) Neurobiologische Grundlagen der Funktionen und degenerativen Störungen des Nervensystems. In: Herdegen T, Tölle TR, Bähr M (eds) Klinische Neurobiologie. Spektrum Akad Verl, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Herrmann G, Selmer T, Jessen HJ, Gokarn RR, Selifonova O, Gort SJ, Buckel W (2005) Two beta-alanyl-CoA:ammonia lyases in *Clostridium propionicum*. FEBS J. 272:813-821
- Hetzel M, Brock M, Selmer T, Pierik AJ, Golding BT, Buckel W (2003) Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. An enzyme complex of propionyl-CoA dehydrogenase and electron-transferring flavoprotein. Eur. J. Biochem. 270:902-910
- Hirth G, Walther W (1985) Synthèse des (R)- et (S)-O-isopropylidène-1,2-glycérols. Détermination de la pureté optique. Helvetica Chimica Acta 68:1863-1871
- Hofmeister AEM, Grabowski R, Linder D, Buckel W (1993) L-Serine and L-threonine dehydratase from *Clostridium propionicum*. Two enzymes with different prosthetic groups. Eur. J. Biochem. 215:341-349
- Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI (1996) Structural and functional aspects of metal sites in biology. Chem. Rev. 96:2239-2314
- Howard BR, Endrizzi JA, Remington SJ (2000) Crystal structure of *Escherichia coli* malate synthase G complexed with magnesium and glyoxylate at 2.0 Å resolution: mechanistic implications. Biochemistry 39:3156-3168
- Jacobs A, Staunton J (1995) Investigation of the stereochemistry of the dehydration of the diketide, (3R)-hydroxybutyrate to crotonate, in the first chain extension cycle on the aspyrone polyketide synthase in intact cells of *Aspergillus melleus*. J. Chem. Soc. Chem. Commun.:863-864
- Johnson MK (1998) Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. Curr. Opin. Chem. Biol. 2:173-181
- Kawaguchi A, Tsubotani S, Seyama Y, Yamakawa T, Osumi T, Hashimoto T, Kikuchi T, Ando M, Okuda S (1980) Stereochemistry of dehydrogenation catalyzed by Acyl-CoA oxidase. J. Biochem. 88:1481-1486
- Kiema TR, Engel CK, Schmitz W, Filppula SA, Wierenga RK, Hiltunen JK (1999) Mutagenic and enzymological studies of the hydratase and isomerase activities of 2-enoyl-CoA hydratase-1. Biochemistry 38:2991-2999
- Kim J, Darley DJ, Buckel W, Pierik AJ (2008) An allylic ketyl radical intermediate in clostridial amino-acid fermentation. Nature 452:239-242
- Kim J, Hetzel M, Boiangiu CD, Buckel W (2004) Dehydration of (R)-2-hydroxyacyl-CoA to enoyl-CoA in the fermentation of α -amino acids by anaerobic bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 28:455-468
- Kim JJ, Miura R (2004) Acyl-CoA dehydrogenases and acyl-CoA oxidases. Structural basis for mechanistic similarities and differences. Eur. J. Biochem. 271:483-493

- Kim JJ, Wang M, Paschke R (1993) Crystal structures of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria with and without substrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7523-7527
- Kim JJ, Wu J (1988) Structure of the medium-chain acyl-CoA dehydrogenase from pig liver mitochondria at 3-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6677-6681
- Koppenhofer R, Weber V, Schurig V (1982) A useful route to (*R*)-Alkyloxiranes of defined enantiomeric purity from (*S*)-amino acids. *Synthesis*:316
- La Roche HJ, Kellner M, Günther H, Simon H (1971) Preparative biochemical synthesis of compounds stereospecifically labelled with hydrogen. II. Stereochemistry of butyryl-CoA dehydrogenase in *Clostridium kluyveri*. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 352:399-402
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lancaster CR, Kroger A, Auer M, Michel H (1999) Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* 402:377-385
- Leeper FJ, Shaw SE, Satish P (1994) Biosynthesis of the indolizidine alkaloid cyclizidine: incorporation of singly and doubly labelled precursors. *Can. J. Chem.* 72:131-141
- Lehman TC, Hale DE, Bhala A, Thorpe C (1990) An acyl-coenzyme A dehydrogenase assay utilizing the ferricenium ion. *Anal Biochem* 186:280-284
- Lehman TC, Thorpe C (1990) Alternate electron acceptors for medium-chain acyl-CoA dehydrogenase: use of ferricenium salts. *Biochemistry* 29:10594-10602
- Lenn ND, Shih Y, Stankovich MT, Liu H-W (1989) Studies of the inactivation of general acyl-CoA dehydrogenase by racemic (methylenecyclopropane)acetyl-CoA - new evidence suggesting a radical mechanism of this enzyme catalyzed reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 111:3065-3067
- Leutwein C, Heider J (2001) Succinyl-CoA:(*R*)-benzylsuccinate CoA-transferase: an Enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *J. Bacteriol.* 183:4288-4295
- Link TA (1997) The role of the 'Rieske' iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q(P)) site of the cytochrome bc₁ complex. The 'proton-gated affinity change' mechanism. *FEBS Lett.* 412:257-264
- Listowsky I, Avigad G, England S (1970) Conformational equilibria and stereochemical relationships among carboxylic acids. *J. Org. Chem.* 35:1080-1085
- Lundquist F (1974) Bestimmung mit Acetyl-CoA-Synthetase und Sulfanilamid. In: Bergenmeyer HE (ed) *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3 edn. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., pp 1578-1583
- Lüthy J, Retey J, Arigoni D (1969) Preparation and detection of chiral methyl groups. *Nature* 221:1213-1215
- Macieira S, Velarde M, Zhang J, Buckel W, Messerschmidt A (2008) Crystal Structure of 4-Hydroxybutyrate CoA-Transferase from *Clostridium aminobutyricum*. *J. Mol. Biol.* Submitted
- Maffioli SI, Marzorati E, Marazzi A (2005) Mild and reversible dehydration of primary amides with PdCl₂ in aqueous acetonitrile. *Org. Lett.* 7:5237-5239
- Magid RM (1980) Nucleophilic and organometallic displacement reactions of allylic compounds: stereo- and regiochemistry. *Tetrahedron* 36:1901-1930
- Manstein DJ, Massey V, Ghisla S, Pai EF (1988) Stereochemistry and accessibility of prosthetic groups in flavoproteins. *Biochemistry* 27:2300-2305
- Manstein DJ, Pai EF, Schopfer LM, Massey V (1986) Absolute stereochemistry of flavins in enzyme-catalyzed reactions. *Biochemistry* 25:6807-6816

- Martins BM, Dobbek H, Çinkaya I, Buckel W, Messerschmidt A (2004) Crystal structure of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase: Radical catalysis involving a [4Fe-4S] cluster and flavin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:15645-15649
- Matthies C, Evers S, Ludwig W, Schink B (2000) *Anaerovorax odorimutans* gen. nov., sp. nov., a putrescine-fermenting, strictly anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50 Pt 4:1591-1594
- Meckenstock RU, Krieger R, Ensign S, Kroneck PM, Schink B (1999) Acetylene hydratase of *Pelobacter acetylenicus*. Molecular and spectroscopic properties of the tungsten iron-sulfur enzyme. *Eur. J. Biochem.* 264:176-182
- Midland MM, McDowell DC, Hatch RL, Tramontano A (1980) Reduction of α,β -acetylenic ketones with *B*-3-pinanyl-9-borabicyclo[3.3.1]nonane. High asymmetric induction in aliphatic systems. *J. Am. Chem. Soc.* 102:867-869
- Molina I, Pellicer MT, Badia J, Aguilar J, Baldoma L (1994) Molecular characterization of *Escherichia coli* malate synthase G. Differentiation with the malate synthase A isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 224:541-548
- Möllering H, Wahlefeld AW, Michael G (1974) Visualisierung NAD(P)-abhängiger Reaktionen. In: Bergenmeyer HE (ed) *Methoden der enzymatischen Analyse*, 3 edn. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., pp 145-153
- Mori K, Sasaki M, Tamada S, Suguro T, Masuda S (1979) Synthesis of optically active 2-ethyl-1,6-dioxaspiro[4.4]nonane (chalcogran), the principal aggregation pheromone of *Pityogenes chalcographus* (L.). *Tetrahedron* 35:1601-1605
- Mozingo R, Wolf DE, Harris SA, Folkers K (1943) Hydrogenolysis of sulfur compounds by Raney nickel catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* 65:1013-1016
- Müh U, Buckel W, Bill E (1997) Mössbauer study of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase - probing the role of an iron-sulfur cluster in an overall non-redox reaction. *Eur. J. Biochem.* 248:380-384
- Müh U, Çinkaya I, Albracht SP, Buckel W (1996) 4-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*: characterization of FAD and iron-sulfur clusters involved in an overall non-redox reaction. *Biochemistry* 35:11710-11718
- Müller U, Buckel W (1995) Activation of (*R*)-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Eur. J. Biochem.* 230:698-704
- Nanninga HJ, Drent WJ, Gottschal JC (1987) Fermentation of glutamate by *Selenomonas acidaminophila* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 147:152-157
- Näser U (2004) Study of the reaction mechanism of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase using isotopically labelled substrates and model compounds. PhD-Thesis, Newcastle University Newcastle upon Tyne, UK.
- Näser U, Pierik AJ, Scott R, Çinkaya I, Buckel W, Golding BT (2005) Synthesis of ^{13}C -labeled γ -hydroxybutyrates for EPR studies with 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase. *Bioorg. Chem.* 33:53-66
- Palmer DRJ, Hubbard BK, Gerlt JA (1998) Evolution of Enzymatic Activities in the Enolase Superfamily: Partitioning of Reactive Intermediates by D-Glucarate Dehydratase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* 37:14350-14357
- Parker D (1991) NMR determination of enantiomeric purity. *Chem. Rev.* 91:1441-1457
- Peters JW, Lanzilotta WN, Lemon BJ, Seefeldt LC (1998) X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angström resolution. *Science* 282:1853-1858
- Pierik AJ, Ciceri D, Bröker G, Edwards CH, McFarlane W, Winter J, Buckel W, Golding BT (2002) Rotation of the exo-methylene group of (*R*)-3-methylitaconate catalyzed by coenzyme B₁₂-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Eubacterium barkeri*. *J. Am. Chem. Soc.* 124:14039-14048

- Poe M, Phillips WD, McDonald CC, Lovenberg W (1990) Proton magnetic resonance study of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65:797-804
- Polito AJ, Sweeley CC (1971) Stereochemistry of the hydroxylation in 4-hydroxysphinganine formation and the steric course of hydrogen elimination in sphing-4-ene biosynthesis. J. Biol. Chem. 246:4178-4187
- Ramachandran PV, Gong B, Brown HC (1993) Asymmetric synthesis of both enantiomers of α -(4-fluorophenyl)-4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinebutanol: Potential antipsychotic agents. Tetrahedron Asymmetry 4:2399-2400
- Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B (1979) Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination. Anal. Biochem. 94:75-81
- Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B (1983) Reassessment of Ellman's reagent. Methods Enzymol. 91:49-60
- Rinaldi PL (1982) The determination of absolute configuration using nuclear magnetic resonance techniques. Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy 15:291-352
- Robbins AH, Stout CD (1989) Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3639-3643
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491
- Scherf U, Buckel W (1991) Purification and properties of 4-hydroxybutyrate coenzyme A transferase from *Clostridium aminobutyricum*. Appl. Environ. Microbiol. 57:2699-2702
- Scherf U, Buckel W (1993) Purification and properties of an iron-sulfur and FAD-containing 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA delta-3-delta-2-isomerase from *Clostridium aminobutyricum*. Eur. J. Biochem. 215:421-429
- Scherf U, Sohling B, Gottschalk G, Linder D, Buckel W (1994) Succinate-ethanol fermentation in *Clostridium kluyveri*: purification and characterisation of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase/vinylacetyl-CoA delta 3-delta 2-isomerase. Arch. Microbiol. 161:239-245
- Schurig V, Leyrer U, Wistuba D (1986) Simple access to highly enantiomerically enriched (S)-3-methyl-1-pentanol, (S)-3-methyl-1-pentene, (2R,3S)-2-deuterio-3-methyl-1-pentanol and (2S,3S)-3-methyl-2-pentanol from natural L-isoleucine. J. Org. Chem. 51:242-245
- Schweiger G, Dutscho R, Buckel W (1987) Purification of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. An iron-sulfur protein. Eur. J. Biochem. 169:441-448
- Scott R, Näser U, Friedrich P, Selmer T, Buckel W, Golding BT (2004) Stereochemistry of hydrogen removal from the 'unactivated' C-3 position of 4-hydroxybutyryl-CoA catalysed by 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase. Chem. Commun. (Camb.):1210-1211
- Seco JM, Quinoa E, Riguera R (2004) The assignment of absolute configuration by NMR. Chem. Rev. 104:17-118
- Selmer T, Buckel W (1999) Oxygen exchange between acetate and the catalytic glutamate residue in glutaconate CoA-transferase from *Acidaminococcus fermentans*. J. Biol. Chem. 274:20772-20778
- Shimohigashi Y, Waki M, Izumiya N (1979) Stereospecific synthesis of D-isothreonine from L-threonine. Bull. Sot. Chim. Jap. 52:949
- Smith DM, Buckel W, Zipse H (2003a) Deprotonation of enoxy radicals: theoretical validation of a 50-year-old mechanistic proposal. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 42:1867-1870

- Smith DM, Buckel W, Zipse H (2003b) Deprotonierung von Enoxy-Radikalen: theoretische Bestätigung eines 50 Jahre alten Mechanismusvorschlags. *Angew. Chem.* 115:1911-1915
- Speranza G, Mueller B, Orlandi M, Morelli CF, Manitto P, Schink B (2003) Stereochemistry of the Conversion of 2-Phenoxyethanol into Phenol and Acetaldehyde by *Acetobacterium sp.* *Helvetica Chimica Acta* 86:2629-2636
- Steensma E, Heering HA, Hagen WR, Van Mierlo CP (1996) Redox properties of wild-type, Cys69Ala, and Cys69Ser *Azotobacter vinelandii* flavodoxin II as measured by cyclic voltammetry and EPR spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* 235:167-172
- Steinman HM, Hill RL (1975) Bovine liver crotonase (enoyl coenzyme A hydratase). EC 4.2.1.17 L-3-hydroxyacyl-CoA hydrolyase. *Methods Enzymol.* 35:136-151
- Stern JR, Campillo Ad (1953) Enzymatic Reaction of Crotonyl Coenzyme A. *J. Am. Chem. Soc.* 75:2277-2278
- Stickland LH (1935) Studies in the metabolism of the strict anaerobes (Genus *Clostridium*): The reduction of proline by *Cl. sporogenes*. *Biochem. J.* 29:288-290
- Sullivan GR, Dale JA, Mosher HS (1973) Correlation of configuration and fluorine-19 chemical shifts of α -methoxy- α -trifluoromethylphenyl acetate derivatives. *J. Org. Chem.* 38:2143-2147
- Switzer RL (1989) Non-redox roles for iron-sulfur clusters in enzymes. *Biofactors* 2:77-86
- Thamer W, Cirpus I, Hans M, Pierik AJ, Selmer T, Bill E, Linder D, Buckel W (2003) A two [4Fe-4S]-cluster-containing ferredoxin as an alternative electron donor for 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Acidaminococcus fermentans*. *Arch. Microbiol.* 179:197-204
- Thauer RK (2007) Microbiology. A fifth pathway of carbon fixation. *Science* 318:1732-1733
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41:100-180
- Trautwein AX, Bill E, Bominaar EL, Winkler H (1991) Iron-containing proteins and related analogs — complementary Mössbauer, EPR and magnetic susceptibility studies. *Structure and Bonding* 78:1-95
- Valentine AM, Wilkinson B, Liu KE, Kornar-Panicucci S, Priestley ND, Williams PG, Morimoto H, Floss HG, Lippard SJ (1997) Tritiated Chiral Alkanes as Substrates for Soluble Methane Monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): Probes for the Mechanism of Hydroxylation. *J. Am. Chem. Soc.* 119:1818-1827
- Volbeda A, Charon MH, Piras C, Hatchikian EC, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1995) Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373:580-587
- Vollmer SJ, Switzer RL, Debrunner PG (1983) Oxidation-reduction properties of the iron-sulfur cluster in *Bacillus subtilis* glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *J. Biol. Chem.* 258:14284-14293
- Wakil SJ, Mahler HR (1954) Studies on the fatty acid oxidizing system of animal tissues. V. Unsaturated fatty acyl coenzyme A hydrase. *J. Biol. Chem.* 207:125-132
- Weisman GR (1983) Nuclear Magnetic Resonance Analysis Using Chiral Solvating Agents. In: Morrison JD (ed) *Asymmetric Synthesis*. Academic Press, New York, p 153
- Wermuth CG (1979) A convenient synthesis of γ -ethoxy- γ -butyrolactone and of succinic semialdehyde. *J. Org. Chem.* 44:2406-2408
- Willadsen P, Buckel W (1990) Assay of 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase from *Clostridium aminobutyricum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 58:187-191
- Willadsen P, Eggerer H (1975) Substrate Stereochemistry of the Enoyl-CoA Hydratase Reaction. *Eur. J. Biochem.* 54:247-252
- Yamaguchi S (1983) Nuclear magnetic resonance analysis using chiral derivatives. In: Morrison JD (ed) *Asymmetric Synthesis*. Academic Press, New York, p 125

Yoshikawa N, Yamada YMA, Das J, Sasai H, Shibasaki M (1999) Direct catalytic asymmetric aldol reaction. *J. Am. Chem. Soc.* 121:4168-4178

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Buckel für die interessante Themenstellung und seine ständige Diskussionsbereitschaft. Ich bin dankbar, dass ich in seiner Arbeitsgruppe so viel lernen durfte. Sein Rat und seine Unterstützung waren unschätzbar wertvoll für mich.

Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer danke ich für seine Unterstützung und die Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu betreuen sowie für die uneingeschränkte Möglichkeit die MALDI-TOF- und EPR-Geräte im MPI zu nutzen.

Herrn Prof. Dr. Bernard T. Golding und seiner Arbeitsgruppe (Newcastle University, Newcastle upon Tyne) danke ich für die Diskussionsbereitschaft und die Zusammenarbeit bei Substratsynthesen für die C3-Position. Hierfür danke ich außerdem Dr. Richard Scott und Dr. Ulrike Näser.

Herrn Dr. Eckhard Bill (Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie, Mülheim) danke ich für die Mössbauer-Messungen und die gute Zusammenarbeit.

Herrn PD Dr. Antonio J. Pierik danke ich für die EPR-Messungen und seine vielen Tipps und Kniffe sowie seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Daniel J. Darley danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Einführung in die synthetische organische Chemie. Thank you very much.

Herrn Jörg Kahnt danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und technische Unterstützung sowie die Möglichkeit MALDI-TOF Messungen durchzuführen.

Herrn Dr. Joshuar Telser (Roosevelt University, Chicago) danke ich für die ENDOR-Messungen.

Herrn Prof. Dr. James S. Remington und seiner Arbeitsgruppe (Institute of molecular biology and departments of chemistry and physics, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403) danke ich für die Plasmide zur Produktion der Malatsynthase aus *Escherichia coli*.

Der Arbeitsgruppe Buckel sowie den benachbarten Arbeitsgruppe Bremer danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Unterstützung.

Meiner Familie und meiner Freundin Christine Schwager danke ich für Liebe, Verständnis und die Unterstützung die dieses Projekt erst ermöglicht haben.

Lebenslauf

Personalien	Peter Friedrich
Geburtstag:	01.01.1978
Geburtsort:	Marburg
Familienstand:	ledig
Konfession:	evangelisch
Schulbildung	1984-1988 Grundschule Fronhausen 1988-1994 Gesamtschule Niederwalgern 1994-1997 humanistisches Gymnasium Philippinum in Marburg Abschluss: Abitur Leistungskurse: 1. Biologie, 2. Chemie
Zivildienst:	1997-08 bis 1998-01 Universitätsklinikum Marburg Medizinisches Zentrum für Augenheilkunde im OP-Bereich, 1998-01 bis 1998-08 Universitätsklinikum Abteilung Nuklearmedizin im Strahlenschutz
Berufsausbildung	1997-10 bis 2003-11 Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg Abschluss: Diplom. Schwerpunkte: 1. Mikrobiologie, 2. Genetik, 3. Biochemie Diplomarbeit bei Prof. Dr. Wolfgang Buckel mit dem Titel „Untersuchungen zur Substrat-Stereochemie der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Dehydratase und zum Mechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-Transferase aus <i>Clostridium aminobutyricum</i> “
Berufliche Tätigkeit	seit 2003-11 wissenschaftlicher Mitarbeiter Philipps-Universität Marburg FB Biologie, Laboratorium für Mikrobiologie, Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Substratstereochemie und Untersuchungen zum Mechanismus der 4-Hydroxybutyryl-CoA-
Dehydratase aus *Clostridium aminobutyricum*

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 22.11.2008

(Ort, Datum)

Peter Friedrich

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)